

Titre: Biocompatibilité des complexes protéines-nanoparticules :
Title: perspectives sur la réponse cellulaire aux nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées, revêtues d'un corona

Auteur: Doris Antoinette Mbeh
Author:

Date: 2014

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Mbeh, D. A. (2014). Biocompatibilité des complexes protéines-nanoparticules :
Citation: perspectives sur la réponse cellulaire aux nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées, revêtues d'un corona [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1641/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1641/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: L'hocine Yahia, & Edward Sacher
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

BIOCOMPATIBILITÉ DES COMPLEXES PROTÉINES–NANOPARTICULES :
PERSPECTIVES SUR LA RÉPONSE CELLULAIRE AUX NANOPARTICULES D'OXYDE
DE FER FONCTIONNALISÉES, REVÊTUES D'UN CORONA

DORIS ANTOINETTE MBEH

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

BIOCOMPATIBILITÉ DES COMPLEXES PROTÉINES–NANOPARTICULES :
PERSPECTIVES SUR LA RÉPONSE CELLULAIRE AUX NANOPARTICULES D'OXYDE
DE FER FONCTIONNALISÉES, REVÊTUES D'UN CORONA

présentée par : MBEH Doris Antoinette

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. SAVADOGO Oumarou, D. d'état, président

M. YAHIA L'Hocine, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. SACHER Edward, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. DEWEZ David, Ph. D., membre

M. GIRARD Denis, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

À tous les miens

REMERCIEMENTS

Cette thèse marque l'aboutissement de quatre années passionnantes de travail et de rencontres, qui auraient été bien fades sans la participation de près ou de loin de nombreuses personnes que je remercie sincèrement pour leur soutien moral ou technique, leurs encouragements et leurs conseils.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury pour l'attention qu'ils ont prêté à mon travail : Drs. Oumarou Savadogo, David Dewez et Denis Girard qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse.

Mes sincères remerciements iront à mes directeurs de thèse, Drs. L'hocine Yahia et Edward Sacher.

Dr Yahia, les mots ne suffiront jamais pour vous dire merci pour votre soutien technique et financier pendant toutes ces années. C'est grâce à vous que j'ai fait mes 'premiers pas' vers la recherche. Dès le premier jour, vous m'avez fait partager votre passion pour la nanotechnologie. Vous avez des qualités humaines exceptionnelles et grâce à votre confiance et votre soutien, j'ai osé me lancer dans de nouvelles directions.

Dr. Sacher, malgré vos nombreux engagements scientifiques, familiaux et religieux, vous avez toujours été très disponible et attentif à mes travaux dans les moindres détails. Votre vision de la recherche m'a permis à de nombreuses reprises de prendre du recul sur mon sujet. J'ai beaucoup appris à vos côtés, et ça ne concerne pas uniquement la physico-chimie des interfaces mais aussi la rigueur dans un travail scientifique.

Vous resterez tous les deux, l'une des rencontres les plus marquantes de cette thèse.

Je tiens à remercier le CRNSG qui a financé ces travaux.

Je pense aussi à tous les membres et amis du laboratoire (LIAB): Laura Karina Mireles mon colocataire de bureau qui a dû, en plus, me supporter au quotidien, les membres plus anciens Rodrigo Franca, Nancy Tawil et Taraneh Samani Djavanbakht, sans oublier les nouveaux comme Sylvie Lau, Rafaella Oliveira Do Nascimento, Arthur Ruellan, Naziha Chirani, Melika Parsapour et tous nos stagiaires.

Ce travail ne serait pas aussi abouti sans les échantillons de Dr Théodore veres et le soutien de son équipe de l'institut des Matériaux industriel (IMI). Je pense au Drs Xuefeng Zhang et Sonia Mansouri qui m'ont aidé à faire fonctionner l'analyseur Apollo et à réaliser la mesure du monoxyde d'azote (NO).

Merci aussi à Dr Yahye Merhi et à son équipe. Lara Bou Khzam, Ahmed Hachem et Rahma qui m'ont toujours soutenu dans l'élaboration de mes protocoles et l'utilisation des équipements du laboratoire de thrombose et hémostase à l'institut de cardiologie de Montréal.

Merci également au feu Dr. Radovan Popovic et son post doc Dr. Abdallah Oukarroum pour les équipements mis à notre disposition.

Tous mes remerciements à Dr Karim Maghni et toute son équipe du centre de recherche du sacré cœur de Montréal qui m'ont accueillis au sein de leur laboratoire et ont mis à ma disposition les outils nécessaires à la réalisation de ce travail. Drs Lyes Tabet et Mélanie Welman mes professeurs. Nos rayons de soleil Zeinab Ali Abbas, Rajaa Chalabi et Bouchra Ouliass. J'ai toujours eu du plaisir à venir travailler chez vous.

Un merci spécial à toi Sylvie Lau pour tes corrections au moment de la rédaction de cette thèse.

Merci aussi à Dr. Pierre Chaurand de l'université de Montréal qui m'a permis d'utiliser le MALDI-TOF SIMS. Merci Mathieu pour ton aide matérielle et technique et Eric pour ton assistance technique.

Je souhaite finir, mais peut-être aurais-je dû commencer par elles, par toutes les personnes qui comptent le plus pour moi et à qui je dédie cette thèse. Tout d'abord à mon mari Esai Nsoumb, dont le soutien et l'amour quotidien me sont indispensables. Merci Esai pour tous les sacrifices que tu as toujours fait pour que je m'épanouisse et que je réalise mes rêves. A ma mère qui n'a pas eu la chance d'assister à ma soutenance.

Enfin, à mes enfants, Sandrine Ngo Nsoumb, Mélissandre Nsoumb Mandari, Claudia Audrey Ngo Nsoumb et Ngan Nsoumb Ngan qui m'ont toujours appuyé au cours de mes longues études.

À vous tous, merci.

RÉSUMÉ

Cette thèse rapporte l'étude de la biocompatibilité des nanoparticules (NPs) d'oxyde de fer (Fe_3O_4) superparamagnétiques candidates à une livraison ciblée des molécules thérapeutiques. Nous nous sommes tout spécialement attachés à étudier l'impact de la composition de surface de ces NPs et l'adsorption des protéines à la surface de ces dernières sur les réponses cellulaires.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord examiné le potentiel toxique la magnétite avec divers fonctionnalisations : celle qui est préparée avec (1) une monocouche d'acide oléique ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$), qui est ensuite converti en (2) une enveloppe de silane contenant une amine ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$), (3) un revêtement de silice ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), et (4) une enveloppe de silane contenant une amine sur un revêtement de silice ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$). La présence de ces groupements à la surface des NPs a été confirmée par l'analyse XPS et la microscopie électronique à transmission (TEM).

Nous avons pu prouver que le potentiel toxique des NPs est dose-dépendant et ainsi déterminer les doses biocompatibles pour chaque fonctionnalisation de surface. L'observation au microscope de la morphologie des cellules exposées aux NPs, leur activité mitochondriale et proinflammatoire ont montré que, en plus des caractéristiques de surface, le milieu de culture cellulaire influence également la cytotoxicité des NPs. Ces résultats montrent clairement que pour pouvoir utiliser nos NPs comme nanovecteur pharmaceutique de façon sécuritaire, nous devons contrôler la fonctionnalisation de surface et l'interaction dynamique entre la NP et le milieu physiologique dans lequel elle est suspendue.

Pour comprendre l'interaction entre la NP et le milieu de culture, dans une première étape, nous avons utilisé trois milieux de culture différents à savoir : DMEM, F-12K et DMEM/F12 (voir annexe A) et la magnétite sans revêtement (Fe_3O_4). Ces milieux ont été enrichis soit avec le sérum bovin (voir annexe B) soit avec un sérum synthétique (SFMS). Nous avons prouvé la présence d'une couronne protéique (corona) sur les NPs suspendues dans les milieux de culture enrichis de sérum bovin. Nous avons également démontré que la formation du corona sur les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) dépend de la composition du milieu de culture et que le potentiel cytotoxique des NPs est influencé par l'interaction NP-protéines.

Dans une deuxième étape, nous avons utilisé un seul milieu de culture (DMEM/F12) et la magnétite avec trois différentes compositions de surface : sans revêtement avec à la surface les groupements hydroxyles (OH) ; avec un groupement amine (NH₂) à la surface et avec un groupement carboxylique (COOH) à la surface. Les résultats montrent que la composition du corona dépend de la composition de surface de la NP et les réponses cellulaires sont également différentes d'une surface à une autre. En fait, certaines protéines (par exemple l'albumine) sont adsorbées uniquement sur les revêtements chargés positivement (NH₂), alors que d'autres (par exemple, le fibrinogène) sont adsorbées sur le revêtement chargé négativement (OH et COOH). La prolifération cellulaire est influencée par la chimie de surface et est dose-dépendante. Les SPIONs chargés avec les groupements carboxyliques sont les plus biocompatibles alors que celles sans revêtement, ayant les groupements hydroxyles à la surface, sont les plus cytotoxiques.

En explorant les trois mécanismes possibles de cytotoxicité, à savoir la production des ions, des espèces réactives d'oxygène et l'adsorption des protéines, nous avons conclu que dans notre cas, l'adsorption des protéines était à l'origine de la cytotoxicité de nos NPs puisque le stress oxydant s'est avéré inexistant et les ions pas assez pour être détectés.

Nous pouvons, à partir de ces résultats, établir une corrélation entre la composition chimique de surface, l'identité des protéines adsorbées et les réponses cellulaires. Mais il faut tenir compte de nombreux autres paramètres liés soit aux NPs comme la charge, l'agglomération, soit au milieu de culture comme la densité de chaque protéine, soit enfin aux conditions expérimentales.

ABSTRACT

This thesis presents the study of the biocompatibility of nanoparticles (NPs) of iron oxide (Fe_3O_4) candidates for targeted delivery of therapeutic molecules. We especially devoted to study the impact of the surface composition of the NPs and protein adsorption at the surface thereof on the cellular responses.

To do this, we first examined the toxic potential of magnetite with various functionalizations: one that is prepared with (1) a monolayer of oleic acid ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$), which is then converted to (2) an envelope silane containing an amine ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$), (3) a coating of silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), and (4) an envelope containing a silane coating on amine silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$). The presence of these groups at the surface of the NPs was confirmed by XPS and transmission electron microscopy (TEM) analysis.

We were able to prove that the toxic potential of NPs is dose-dependent and we determine the biocompatible doses for each surface functionalization. Microscopic observation of the morphology of the cells exposed to NPs, and their proinflammatory and mitochondrial activity showed that, in addition to surface features, the cell culture medium also affect the cytotoxicity of the NPs. These results clearly show that in order to use our NPs as pharmaceutical nanocarrier safely, we need to control the surface functionalization and the dynamic interaction between the NP and the physiological environment in which it is suspended.

To understand the interaction between the NP and the culture medium, as a first step, we used three different culture media namely: DMEM, F-12K and DMEM / F12 (see Appendix A) and uncoated magnetite (Fe_3O_4). These media were enriched with either fetal bovine serum (see Appendix B) or with a synthetic serum (SFMS). We have proved the presence of a protein corona on NPs suspended in culture media enriched with bovine serum. We also demonstrated that the formation of the corona depends on the composition of the culture medium and that the cytotoxic potential of the NPs is influenced by NP-protein interaction.

In a second step, we used one culture medium (DMEM / F12) and the magnetite with three different surface compositions: uncoated SPIONs with hydroxyl groups (OH) on the surface; coated SPIONs with an amine group (NH_2) on the surface and the last one with a carboxylic group (COOH) on the surface. The results show that the composition of the corona dependst on

the surface composition of the NP and cellular responses are also different from one surface to another. In fact, some proteins (e.g. albumin) are adsorbed on the coatings only positively charged (NH_2), while others (e.g., fibrinogen) are adsorbed on the negatively charged coatings (OH and COOH). Cell proliferation is influenced by the surface chemistry and is dose-dependent. SPIONs coated with carboxylic groups are more biocompatible while those uncoated, having hydroxyl groups on the surface are the most cytotoxic.

Exploring three possible mechanisms of cytotoxicity, i.e., the production of ions by the SPIONs in the culture media, reactive oxygen species and protein adsorption, we found that in our case, protein adsorption was behind the cytotoxicity of our NPs since oxidative stress have been proved non-existent and there are not enough ions in the culture media to be detected .

From these results, we can make a first correlation between the chemical composition of the surface, the identity of the adsorbed proteins and cellular responses. But we must take into account many other parameters related either to the NPs such as the charge, the agglomeration status, or related to the culture medium as the density of each protein, or finally to the experimental conditions.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES.....	XVI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XX
LISTE DES ANNEXES.....	XXII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE SUR LA BIOCOMPATIBILITÉ DES NANOPARTICULES	4
2.1 Nanomatériaux	4
2.1.1 Nanomatériaux pour des applications médicales	5
2.1.2 Nanoparticules d'oxyde métallique : l'oxyde de fer	5
2.1.3 Nanoparticules fonctionnalisées.....	7
2.1.4 Paramètres physico-chimiques déterminant l'interaction particule – cellule.....	7
2.2 Réponses biologiques aux nanoparticules	15
2.2.1 Paramètres physico-chimiques déterminant l'interaction particule–milieu physiologique	15
2.2.2 Stabilité et dégradation des NPs fonctionnalisées.....	17
2.2.3 Réponse cellulaire aux SPIONs	18
CHAPITRE 3 OBJECTIFS, APPROCHE ET HYPOTHÈSE	25

3.1	Contexte de l'étude.....	25
3.2	Objectif général	25
3.3	Objectifs spécifiques	26
3.3.1	Élaborer les protocoles des tests de cytotoxicité en tenant compte des influences des paramètres physico-chimiques des NPs.	26
3.3.2	Identifier les paramètres biologiques, liés aux milieux de culture, qui influencent le potentiel cytotoxique des NPs	26
3.3.3	Identifier les caractéristiques des protéines adsorbées à la surface des NPs qui influencent la biocompatibilité.....	26
3.4	Approche et Hypothèse	26
3.4.1	Contrôle du milieu de culture.....	26
3.4.2	Caractérisation des principales propriétés physico-chimiques des NPs avant et après l'incubation dans le milieu de culture cellulaire.	27
3.4.3	Analyse des corrélations.....	27
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: IN VITRO BIOCOMPATIBILITY ASSESSMENT OF FUNCTIONALIZED MAGNETITE NANOPARTICLES: BIOLOGICAL AND CYTOTOXICOLOGICAL EFFECTS.....		28
4.1	Abstract	28
4.2	Introduction	29
4.3	Materials and methods	31
4.3.1	Nanoparticles.....	31
4.3.2	Cytotoxicity tests.....	33
4.4	Results	36
4.4.1	Nanoparticle characterization.....	36
4.4.2	Viability of cells after incubation with nanoparticles	39
4.5	Discussion	43

4.5.1	Cell morphology.....	43
4.5.2	Effect of nanoparticle functionalization.....	44
4.5.3	Effect of corona.....	44
4.5.4	Effect of culture medium.....	45
4.6	Conclusions	46
4.7	References	47
CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : PROTEIN CORONA FORMATION ON MAGNETITE		
NANOPARTICLES: EFFECTS OF CULTURE MEDIUM COMPOSITION, AND ITS		
CONSEQUENCES ON SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLE CYTOTOXICITY 51		
5.1	Abstract	51
5.2	Introduction	52
5.3	Materials and methods	54
5.3.1	Particle Preparation	54
5.3.2	Particle characterization	55
5.3.3	Cytotoxicity Assays.....	57
5.4	Results	59
5.4.1	Particle Characterization	59
5.4.2	Cytotoxicity Assays.....	66
5.5	Discussion	68
5.5.1	Adsorption of proteins from culture medium.....	68
5.5.2	Effects of corona on NP surface properties.....	70
5.5.3	Cytotoxicity	70
5.6	Conclusions	72
5.7	References	73

CHAPITRE 6 ARTICLE 3: HUMAN ALVEOLAR EPITHELIAL CELL RESPONSES TO CORE-SHELL SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES (SPIONS)..... 80

6.1	Abstract	80
6.2	Introduction	81
6.3	Materials and methods	84
6.3.1	Chemical Reagents	84
6.3.2	Synthesis of SPIONs	84
6.3.3	Particle Characterization	85
6.3.4	Protein Adsorption onto the SPIONs	85
6.3.5	Cytotoxicity Assay	86
6.3.6	Determination of reactive oxygen species (ROS)	88
6.4	Results	89
6.4.1	Particle Characterization	89
6.4.2	Biocompatibilities of SPIONs	94
6.5	Discussion	98
6.6	Conclusions	102
6.7	References	103

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE 109

7.1	Le choix du modèle cellulaire	109
7.2	Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer fonctionnalisées comme vecteurs de molécules dans les voies respiratoires.....	110
7.3	Preuve du concept du nanovecteur à base de SPIONs	111
7.4	L'évaluation de la biocompatibilité.....	111
7.5	Effets de la composition du milieu de culture sur le potentiel cytotoxique des nanoparticules superparamagnétiques.....	115

7.6	Effet de la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique sur les réponses des cellules épithéliales alvéolaires	119
7.7	Défis à relever lors des études de la formation du corona et l'exploitation de ce phénomène	120
7.8	Contamination et stérilisation.....	121
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		124
RECOMMANDATIONS		126
RÉFÉRENCES.....		127
ANNEXES.....		153

LISTE DES TABLEAUX

Table 4-1 : Elemental composition on NPs surface	37
Table 4-2: Elemental composition on NPs surface before and after suspension in the Ham's F-12K.....	38

LISTE DES FIGURES

Figure 4-1: TEM images of (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$, (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, and (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ NPs.....	36
Figure 4-2: Optical photographs of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$ NPs, which can be easily dispersed in hexane (left); after silica coating, the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ NPs can be dispersed in aqueous solution (right).	37
Figure 4-3: XPS survey spectra of (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$, (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ and (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ NPs.....	38
Figure 4-4 : Elemental composition of NP surfaces before and after suspension in the Ham's F-12K, as determined by XPS. E, elements; AS, as synthesized; CM, after suspension in the culture media; C, after contact with cells.....	39
Figure 4-5: Morphological differences of the A549 cells before and after exposure to $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$. (a) Control: no treatment during 24 h, (b) exposure for 24 h, (c) control: no treatment for 72 h, (d) exposure for 72 h.	40
Figure 4-6: Reduction of cellular proliferation with increasing concentration of NPs: (a) Control, (b) 0.15, (c) 0.47, and (d) 0.90 mg/mL.....	40
Figure 4-7: Effect of nanoparticles on the secretion of LDH by A549 cells.	41
Figure 4-8: Quantity of IL-6 secreted by A549 cells exposed to NPs at various concentrations ..	42
Figure 4-9 : Cellular viability as a function of duration, at a NP concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	42
Figure 4-10 : Cellular viability after 72 h of exposure of NPs left in the culture medium for 2 (N) and 24 h (NT) before contact with the cells.	43
Figure 5-1: <i>a</i>) HRTEM photomicrographs of hard protein coronas formed in the various media, supplemented with FBS, after washing. b) Protein adsorption ability of SPIONs in the various media, c) FTIR spectrum of SPIONs immersed in DMEM/F12 cell culture medium containing 10% FBS.....	60
Figure 5-2: MALDI TOF-SIMS spectra of SPIONs after 1h of incubation at 37°C, at concentrations of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (i) and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ii), in the various culture media, supplement with 10% (v/v) FBS: (a) DMEM; (b) DMEM/F12 and (c) F-12K.	61

- Figure 5-3: MALDI TOF-SIMS spectra of SPIONs after 24h of incubation at 37°C, at a concentration of 100 µg/ml, in the various culture media that have been supplemented with 10% (v/v) FBS: (a) DMEM; (b) DMEM/F12 and (c) F-12K. (d) in culture media supplemented with SFMS.62
- Figure 5-4: Sizes and ζ potentials of SPIONs in water at three concentrations (10, 50 and 100 µg/ml); (a) hydrodynamic diameters of SPIONs, measured by dynamic light scattering (DLS); (b) ζ potentials of the same particles, measured by electrophoresis.63
- Figure 5-5: Size distribution of SPIONs prepared in DMEM (A-C), F-12 K (D-F), DMEM/F-12 K (G-I) at three different concentrations: A (10), B (50) and (C) 100 µg/ml.64
- Figure 5-6: ζ potentials of in different dispersion media at concentrations of 10, 50 and 100 µg/ml.65
- Figure 5-7: Zeta potential measurements of Fe₃O₄ SPIONs in water. The graph indicate the isoelectric point depending on the concentration of Fe₃O₄. We found that the lowest isoelectric point value is around 4 for the concentration less than 10 µg / ml. this value increases with the concentration to reach a plateau at about 9.66
- Figure 5-8: Effect of SPIONs on the mitochondrial function of A549 cell incubated for 24 h in three different culture media containing FBS or SFMS. Cells were exposed to different concentrations of SPIONs for 24 h. At the end of the incubation period, mitochondrial function was determined using the MTT reduction assay. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. The asterisk (*) denotes a statistically significant difference from non-treated control ($p < 0.05$).67
- Figure 5-9: Cellular metabolism was determined using the PrestoBlue assay. The concentration of 100 µg/ml of graphene oxide was used as the positive control. There is no significant different between the control and the SPIONs ($p < 0.05$).67
- Figure 5-10: Effect of different SPIONs on the viability A549. Cells were treated with a concentration of 100 µg/ml for 24, in the presence of FBS and SFMS, prior to the cell viability being determined by the Trypan Blue exclusion test assay. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. There is no significant difference, compared

with the corresponding non-treated control, except in the case of DMEM/F12 with FBS, ($p < 0.05$).....	68
Figure 6-1: i) HRTEM images of a) Fe_3O_4 , b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ SPIONs;	90
Figure 6-2: (a) Size distribution of Fe_3O_4 (filled triangles), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ (filled circles) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ (empty circles). (b) Evolution of the zeta potential with pH for Fe_3O_4 (filled triangles), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ (filled circles) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ (empty circles).	91
Figure 6-3 : Zeta potentials of nanoparticles in (a) PBS, (b) DMEM/F12, (c) DMEM/F12 + SFMS and (d) DMEM/F12 + FBS, at concentrations of 100 and 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	92
Figure 6-4: Protein adsorption capacities of the three SPIONs via the Coomassie Blue fast staining method.	93
Figure 6-5: MALDI TOF-SIMS spectra of proteins adsorbed on (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$, after incubation with cell culture media (DMEM/F12) with 10 % FBS for 24 h at 37°C	94
Figure 6-6: Effect of the three SPIONs on the viability of A549 cells (A-Number of living cells; B- Number of dead cells). All incubations were carried out in the presence of serum.....	95
Figure 6-7 : Effect of the three SPIONs, dispersed in DMEM/F12, on cellular metabolism. A- in the presence of fetal bovine serum (FBS); B- in serum-free media supplement (SFMS). A549 cells were treated for 24 h with five concentrations of each dispersion, and the metabolism was measured by PrestoBlue assay	96
Figure 6-8: Cell viability of A549 cells after culturing with bare and coated SPIONs. The cells were exposed to SPIONs for 24 h and mitochondrial activity was determined by the MTS assay.	97
Figure 6-9 : Quantification of oxidative stress in human epithelial cells treated with Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ for 24 h. Cells were incubated with these SPIONs for 24h and DCFH-DA was added before being analysed by fluorescence spectrophotometry at excitation and emission wavelength of 485 and 527 nm, respectively. Untreated cells were used to quantify basal oxidation, while tBHP (500 μM) was used as the positive control. Data are shown as mean \pm SD of 4 individual experiments.....	98

Figure 7-1: Localisation et observation microscopique des pneumocytes II : Organisation cellulaire des alvéoles (SIMON-DECKERS, 2008).	109
Figure 7-2: Illustration de la composition de surface de nos SPIONs	119

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A549:	Cellules épithéliales alvéolaires humaines
AEAP3:	N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl trimethoxysilane
AFM:	Microscopie à force atomique
APS:	3-aminopropyltriéthoxysilane
APTES:	Aminopropyltriéthoxysilane
ASTM:	American Society for Testing and Materials
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	Adénosine tri phosphate
BSA:	Albumine de sérum bovin
CD:	Dichroïsme circulaire
CES:	Carboxyethylsilanetriol
DCF:	Dichlorofluoroscein
DLS :	Diffusion dynamique de la lumière
DMEM:	Dubelcco's modified eagle medium
DMSA:	Acide dimercaptosuccinique
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
ELISA :	méthode immuno-enzymatique (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
F-12K:	Ham's F-12K (Kaighn's) Medium
FTIR :	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GSH:	Glutathion
H2DCF-DA:	2,7-dichlorofluoroscein diacetate
HRMET:	Microscope Electronique en Transmission à Haute Résolution
ICP-MS:	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif
IEP:	point isoélectrique
IL :	Interleukin
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
ISO:	Organisation internationale de normalisation
ITC :	Calorimétrie de titration isotherme
LDH :	Lactate Déshydrogénase

MACS:	Magnetic-activated cell sorting
MALDI TOF-SIMS:	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight secondary ion mass spectrometry
MET ou TEM:	Microscope Electronique à Transmission
MPEG:	Methoxypoly(ethylene glycol) PAA
MS:	Spectrométrie de masse
MTS:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
MTT :	Bromure de 3(4.5-diméthylthiazol-2-yl)-2.5-diphényltétrazolium
NO :	monoxyde d'azote
NPs :	Nanoparticules
PB:	PrestoBlue
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PEG :	Polyethylene Glycol
QD :	Quantum Dots
RNS :	Espèces réactives d'azote
ROS :	Espèces réactives d'oxygène
SFMS:	Serum-Free medium Supplement Kit
SIMS :	Spectroscopie de masse des ions secondaire
SPION :	Nanoparticule superparamagnétique d'oxyde de fer
SPR :	Résonance plasmonique de surface
SWNT :	Nanotubes de carbone monoparoi
tBHP:	t-butyl-hydroperoxide
TEOS :	Tetraethoxysilane
TEPSA:	3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride
TFA:	Trifluoroacetic acid
TNF-α:	Facteur de nécrose tumorale
TOF SIMS:	Time of Flight Secondary Ionization Mass Spectroscopy
TPED:	N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine
XPS :	Spectroscopie de photoélectrons X

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A - Composition des milieux de culture et Composition du serum bovin fœtal	153
ANNEXE B – Preuve de concept	157

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La course à la réduction en taille des particules a été rêvée et initiée par Richard Feynman, à la fin des années 50 lors de son fameux discours : ‘There is plenty of room at the bottom’ (Feynman, 1959) laissant entrevoir un nouveau domaine de recherche. En effet, à l’échelle de quelques nanomètres, de nouvelles propriétés apparaissent et sont fortement exaltées. Bien qu’existent depuis les années 1980, les nanosciences et nanotechnologies ont pris un réel envol depuis le début du XXI^{ème} siècle (Mnyusiwalla, Daar, & Singer, 2003; Mor, Shankar, Paulose, Varghese, & Grimes, 2006). Ces disciplines, véritables convergences entre la physique, la chimie, la biologie et l’ingénierie, étudient et mettent en pratique la conception et l’utilisation des nanoparticules (NPs) (Dujardin & Mann, 2002; Nirmal & Brus, 1999).

Selon la National Science Foundation (NSF) américaine, le marché mondial des nanotechnologies, encore dans ses prémices en 2001, était déjà estimé à 40 milliards d’euros et les biens et services générés par l’engagement massif des budgets de recherche et développement pour l’accélération de l’innovation pourraient représenter jusqu’à mille milliards de dollars chaque année entre 2010 et 2015. On retrouve actuellement les NPs dans les domaines de l’électronique, la construction, les cosmétiques, la protection de l’environnement, la médecine etc. (Kruis, Fissan, & Peled, 1998; Zhang, W. X., 2003). Du point de vue biologique et médical, le principal intérêt pour les NPs provient du fait qu’elles sont assez petites pour interagir avec les cellules et les tissus; elles peuvent potentiellement atteindre des cibles inaccessibles auparavant et franchir les barrières physiologiques. C’est ainsi que l’utilisation des NPs permettra d’améliorer la détection précoce et le traitement de nombreuses pathologies (infections, cancers, maladies auto-immunes, etc.). L’exposition aux NPs dans le cadre de la nano-médecine implique leur ingestion, inhalation ou injection délibérée et directe dans le corps. Il est donc important de s’assurer qu’elles ne causent pas des dommages. Malgré les énormes progrès dans le domaine des nanosciences, très peu de choses sont connues sur les mécanismes détaillés d’interaction entre les dispositifs à l’échelle nanométrique (les nano-dispositifs) et le système biologique. Il semble évident, selon certaines études (Cedervall, Lynch, Foy, et al., 2007; Mahmoudi, Sant, Wang, Laurent, & Sen, 2011), que les réponses biologiques en présence des nano-biomatériaux résultent des interactions complexes. Ces dernières dépendent principalement des propriétés physico-chimiques de la surface de ces NPs, de la composition du milieu biologique et d’un phénomène

d'adsorption des biomolécules, principalement les protéines, à la surface de ces NPs qui forme une couche appelée « corona » ou couronne protéique. Les études qualitatives et quantitatives de ce «corona » sont encore rares (Rocker, Potzl, Zhang, Parak, & Nienhaus, 2009). De ce fait, la corrélation entre les propriétés physico-chimiques des NPs et l'identité des protéines adsorbées, modulant par la suite la réponse cellulaire est toujours méconnue. Des études détaillées de la manière dont ces propriétés régissent le revêtement biologique des NPs avec les biomolécules sont nécessaires pour comprendre comment ces interactions peuvent être contrôlées, afin que le potentiel des NPs puisse être pleinement exploitées et utilisées de manière sécuritaire (Colvin, 2003).

Ce projet de doctorat fait partie d'un plus large projet dont l'objectif principal est de développer des nano-vecteurs magnétiques capables de mener des substances thérapeutiques, tels que le monoxyde d'azote (NO) jusqu'à la paroi alvéolaire. Pour cela, il faut fonctionnaliser la surface des NPs superparamagnétiques (magnétite - Fe_3O_4), y accrocher les molécules de NO et les insérer dans des microsphères polymériques de chitosane. Après inhalation de ces complexes NPs- NO- chitosane, grâce à la température et au pH local, la biodégradation du chitosane permettra la libération contrôlée du gaz NO dans les quantités nécessaires et à des doses sécuritaires. Le volet qui nous concerne dans ce travail est d'évaluer la biocompatibilité des NPs à chaque étape de leur fonctionnalisation. Le terme biocompatibilité étant très large, notre objectif spécifique est de trouver une corrélation entre les réactions cellulaires et la variation des caractéristiques de surface des NPs en interaction avec le milieu biologique. Nous détaillerons le rôle que joue le revêtement de surface de ces nanoparticules dans leur comportement dans des milieux physiologiques : les critères optimaux de revêtement de surface seront mis en lumière. Nous nous intéresserons ensuite à la biocompatibilité de ces nanoparticules magnétiques en nous focalisant sur leurs impacts sur les réponses cellulaires. Après avoir décrit les principaux facteurs qui influencent leur potentiel toxique tel que la charge, l'adsorption des protéines, le revêtement de surface etc., nous présenterons les mécanismes de toxicité à envisager pour un contrôle de la biocompatibilité essentiel pour une application biomédicale.

Cette thèse se divise en cinq grands chapitres. Dans le premier chapitre, sont présentées une revue de la littérature, suivie de notre hypothèse et l'approche que nous avons choisie pour résoudre la problématique. Cette approche inclut l'identification des paramètres biologiques, liés aux milieux de culture, et les caractéristiques des protéines adsorbées à la surface des NPs qui influencent la

biocompatibilité via des modifications de surface afin d'établir les corrélations entre les caractéristiques des protéines adsorbées et les réponses cellulaires.

Les trois chapitres suivants (III, IV et V) sont consacrés aux résultats et présentent trois articles publiés dans trois journaux différents. Ma contribution dans chaque article est d'au moins 75% du travail et couvre la revue de la littérature, les expérimentations au laboratoire, les analyses des données, la rédaction de ces articles et leur soumission. Le premier article concerne le premier objectif qui est d'optimiser le potentiel cytocompatible des SPIONs. Ce premier article, inséré dans le chapitre III, présente les méthodes de modification de surface de la magnétite, une technique de fonctionnalisation pour une monocouche et une autre méthode pour une double couche ainsi que la caractérisation des surfaces modifiées. L'activité de ces NPs et leur biocompatibilité sont aussi évaluées grâce à des essais de viabilité et prolifération cellulaire et des essais d'évaluation des cytokines par le test ELISA. Dans cet article, il est démontré que l'activité biologique des NPs est influencée par le revêtement de surface plus que le noyau de la NP de manière dose/dépendante. Le temps d'exposition est également important.

Le second article, présenté au chapitre IV, vise à identifier les protéines qui forment le corona en fonction de la composition du milieu de culture via plusieurs techniques telles que la spectroscopie infrarouge FTIR, la diffusion dynamique de lumière (DLS) et une spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI-TOF). Nous avons démontré que la composition du milieu de culture cellulaire influence la composition du corona et sa dynamique. Cette couronne protéique influence l'état de dispersion des NPs et de ce fait la réponse cellulaire.

Le troisième article est inséré au chapitre V et porte sur le dernier objectif de la thèse soient les corrélations entre les caractéristiques des protéines adsorbées et la biocompatibilité. Il présente les résultats de l'évaluation *in vitro* du potentiel cytocompatible de différents revêtements de la magnétite après adsorption de protéines identifiées et quantifiées.

Enfin une discussion générale est présentée, suivie d'une section réservée aux conclusions générales et aux perspectives futures du projet de doctorat.

CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTERATURE SUR LA BIOCOMPATIBILITÉ DES NANOPARTICULES

2.1 Nanomatériaux

Les nanomatériaux sont des matériaux naturels, formé accidentellement ou manufacturés contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. Il existe deux méthodes de fabrication des nano-objets. Une méthode dite « ascendante » (ou bottom up) : Cette méthode permet l'assemblage ou le positionnement d'atomes ou de molécules de façon précise permettant ainsi la fabrication de matériaux dont la structure est parfaitement maîtrisée. Cette méthode fait appel à des procédés d'élaboration principalement physiques et chimiques. La seconde méthode est dite « descendante » (ou top down) : Elle consiste à miniaturiser les systèmes actuels. Les structures sont ainsi graduellement sous dimensionnées jusqu'à atteindre des proportions nanométriques. Cette méthode fait appel à des procédés principalement mécaniques par exemple les broyeurs à bille (Lemine et al., 2011). En raison de leurs propriétés spécifiques, les nanomatériaux trouvent de nombreuses applications dans des domaines variés. Certaines des applications les plus importantes sont dans les industries de catalyse, de revêtement de surface, du textile, du stockage de données, de l'électronique, de la biotechnologie, des soins de santé, du biomédical et les industries chimique et pharmaceutique.

Dans le domaine biomédical, son potentiel est énorme en raison de l'échelle comparable entre les nanomatériaux et les matériaux biologiques, par exemple, les anticorps et les protéines. Ceci facilite l'utilisation de ces nanomatériaux pour des applications biologiques et médicales jusqu'à présent inconnues. Par souci de simplicité, les nanomatériaux ont été divisés en 11 catégories en fonction de leur forme et leurs caractéristiques physiques. Ce sont des nanoparticules, nanofils, nanotubes, nanocubes, nanocanaux, nanofilms, des dendrimères, des micelles et des liposomes. Chacune de ces catégories est subdivisée sur la base de la nature chimique du nanomatériau, à savoir les métaux, les oxydes métalliques, les polymères, les composites, les nanomatériaux biologiques et les matériaux à base de carbone.

2.1.1 Nanomatériaux pour des applications médicales

Les applications des nanomatériaux en médecine sont le diagnostic médical, le traitement, la fabrication des dispositifs médicaux et l'ingénierie tissulaire. Les nanoparticules (NPs) sphériques sont, de loin, les plus largement développées et utilisées pour ces applications médicales. Celles-ci peuvent être classées dans les métaux, les oxydes métalliques, les céramiques, les polymères, le carbone, les alliages, les composites, les nanoparticules biologiques et les nanoparticules avec revêtement. Parmi les NPs métalliques, les matériaux les plus importants sont l'or (Au), l'argent (Ag), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le cobalt (Co), le nickel (Ni), la platine (Pt), le palladium (Pd) et le rhodium (Rh) (Krishna, Li, Li, & Kumar, 2013). Toutefois, les applications biomédicales des nanomatériaux magnétiques monométalliques, par exemple, Fe, Co et Ni n'ont pas été explorées en raison de leur sensibilités à l'oxydation ainsi que leur toxicité, même si elles présentent des propriétés magnétiques meilleurs que celles de l'oxyde de fer bien étudié.

2.1.2 Nanoparticules d'oxyde métallique : l'oxyde de fer

Parmi les nanoparticules d'oxyde métallique, les plus courantes sont : les oxydes de titane (TiO_2), les oxydes de fer ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et Fe_3O_4), les oxydes de zinc (ZnO), les oxydes d'aluminium (Al_2O_3) et la silice (SiO_2) pour ne citer que ceux-là. Nous nous intéresserons plus particulièrement dans cette thèse aux nanoparticules d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$) fonctionnalisées.

Des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) sont de petites particules synthétiques $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ou Fe_3O_4 avec un noyau de taille < 10 nm et un revêtement organique ou inorganique. Le terme " superparamagnétisme " est utilisé pour faire une analogie entre le comportement d'un atome paramagnétique ayant un moment magnétique faible et celui d'une particule magnétique de taille nanométrique ayant un plus grand moment magnétique qui provient de la synergie de plusieurs rotations atomiques (Schutt et al., 1997). En l'absence de champ magnétique, les SPIONs ne montrent pas d'interaction magnétique parce que l'énergie magnétique d'interaction est inférieure à de l'énergie ambiante, kT ; ceci constitue une caractéristique essentielle pour leur application biomédicale (Meza, 1997; Neuberger, Schopf, Hofmann, Hofmann, & von Rechenberg, 2005). La magnétisation superparamagnétique, par rapport aux matériaux paramagnétiques normaux, est beaucoup plus élevée et peut atteindre la saturation de magnétisation de l'oxyde de fer ferromagnétique. Ce comportement permet le suivi

de ces particules dans un gradient de champ magnétique, sans perdre l'avantage d'une suspension colloïdale stable. En outre, l'application d'un champ magnétique alternatif, le chauffage des particules sur la base du mécanisme de relaxation de Néel peut être observé (Neuberger et al., 2005).

Les NPs d'oxyde de fer sont les plus largement étudiées parmi les nanomatériaux magnétiques, car elles sont considérées comme étant biocompatibles, biodégradables, et s'avèrent très prometteuses pour plusieurs applications médicales.

En tant qu'agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM), les NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) sont mises au point pour le diagnostic des tumeurs et des micrométastases (Fukuda et al., 2006; Hu et al., 2006; Zhang, C. F. et al., 2007), l'imagerie du tractus gastro-intestinal (Herrmann et al., 2005), du foie (Kim, M. J. et al., 2003; Reimer & Balzer, 2003), de la rate (Storm, Abbitt, Allen, & Ros, 1992), de la plaque d'athérosclérose (von zur Muhlen et al., 2007; Yancy et al., 2005), du rein (O. Hauger et al., 2004), de l'angiogenèse (Kang, Josephson, Petrovsky, Weissleder, & Bogdanov, 2002), de l'apoptose (Zhao, M., Beauregard, Loizou, Davletov, & Brindle, 2001), de l'expression de certains gènes (Weissleder et al., 2000), des cellules souches embryonnaires (Tallheden et al., 2006) et la signalisation biomoléculaire (Atanasijevic, Shusteff, Fam, & Jasanoff, 2006).

L'utilisation des NPs d'oxyde de fer dans le traitement médical est également étudiée. Les premiers essais cliniques utilisant des NPs d'oxyde de fer pour le ciblage de médicaments ont été signalés en 2001 (Yong, 2005). Les NPs fonctionnalisées (PVA- SPIONs) sont des nanovecteurs de médicaments potentiels pour une livraison au cerveau pour le traitement de maladies neurodégénératives en générales (Cengelli et al., 2006) et dans les tumeurs malignes, en particulier (Gutin, 2002; Reddy et al., 2006). Une nanosonde multifonctionnelle capable de cibler des cellules de gliome, détectables par l'IRM et par microscopie à fluorescence, a également été étudiée en 2005 (Veiseh et al., 2005). Des cellules souches mésenchymateuses marquées magnétiquement avec les SPIONs ont été ciblées sur des sites d'intérêt ouvrant ainsi la possibilité de livraison *in vivo* des cellules souches (Arbab et al., 2004). L'application la plus importante des SPIONs en thérapie est l'hyperthermie. L'hyperthermie est une procédure thérapeutique utilisée pour augmenter la température d'une région du corps atteinte par une tumeur maligne ou d'autres tumeurs. Le raisonnement est basé sur l'effet de la destruction des cellules à des températures

supérieures à 41-42 °C. Des NPs d'oxyde de fer ont été largement étudiées pour le traitement de divers types de cancers en utilisant leur capacité hyperthermique sous des champs magnétiques alternatif (Hoopes et al., 2007; Kettering et al., 2007). Un certain nombre d'approches sont utilisées pour leur biofonctionnalisation à l'égard de leurs applications médicales (Gupta, A. K. & Gupta, 2005b; Gupta, A. K., Naregalkar, Vaidya, & Gupta, 2007).

2.1.3 Nanoparticules fonctionnalisées

Le revêtement de surface, encore appelé fonctionnalisation, par des molécules organiques joue trois principaux rôles : (i) stabiliser les nanoparticules en suspension dans les milieux biologiques avec un pH d'environ 7,4 et une concentration élevée de sel, (ii) fournir des groupes fonctionnels à la surface pour des interactions contrôlées, et enfin (iii) éviter l'élimination immédiate par le système réticuloendothélial (RES) (Zhu et al., 2009).

2.1.4 Paramètres physico-chimiques déterminant l'interaction particule – cellule

Les nanoparticules se situent à une échelle moléculaire comprise entre celle d'une molécule d'ADN de 2.5 nm de large et celle d'un globule rouge humain de 800 nm de diamètre. Cette taille leur permet d'interagir facilement avec les composants biologiques. Cette propriété est très étudiée en pharmacologie car elle permet d'utiliser les NPs comme vecteurs de médicaments vers des cellules cibles. Les effets de certains paramètres physico-chimiques sur l'interaction NPs / milieu physiologique et sur leur devenir intracellulaire ont été étudiés pour un grand nombre de systèmes. Les résultats les plus significatifs sont les suivants.

2.1.4.1 Effet de la taille des nanoparticules et leur biodistribution

L'effet de la taille des particules sur leur devenir dans un milieu physiologique est un thème de recherche des plus importants du fait de ses implications dans la libération contrôlée de médicaments et dans la toxicité associée aux NPs (Unfried et al., 2007). Plusieurs propriétés importantes des particules sont associées à la taille de la particule : l'état d'agglomération, l'internalisation, le temps de circulation, le ciblage et la clairance (Kohane, 2007; Singh, M., Chakrapani, & O'Hagon, 2007). Le diamètre de particule détermine leur transport et leur adhésion dans les voies aériennes, gastro-intestinales et les capillaires sanguins (Goldsmith &

Turitto, 1986; Shinde Patil, Campbell, Yun, Slack, & Goetz, 2001). Le dépôt des NPs dans l'appareil respiratoire se fait essentiellement par diffusion (Witschger & Fabries, 2005). La localisation de ce dépôt dépend de la taille, de la forme et de l'état d'agglomération des particules. Ainsi dans le cas de particules sphériques non agglomérées, la densité du dépôt en fonction de leur taille a pu être modélisée dans les différentes régions du tractus respiratoire : la région extra-thoracique (incluant la bouche, le nez, le larynx et le pharynx), l'arbre trachéo-bronchique (qui s'étend de la trachée aux bronches) et la région alvéolaire (constituée des bronchioles terminales et des alvéoles). Selon ce modèle, les nanoparticules comprises entre 5 et 100 nm de diamètre se déposent essentiellement dans la région alvéolaire. Suite au dépôt dans les voies respiratoires, l'organisme peut mettre en œuvre différents mécanismes de clairance des nanoparticules en fonction de leur localisation, mais aussi de leur taille et de leur nature (Buzea, Pacheco, & Robbie, 2007; Yang, W., Peters, & Williams, 2008). L'escalier mucociliaire est le principal mécanisme mis en jeu pour éliminer les particules des régions extra-thoracique et trachéo-bronchique : le mouvement des cils emmène le mucus contenant les particules piégées jusqu'au pharynx où il sera éliminé dans le tractus intestinal. C'est une élimination rapide (la plus grande partie en 24h dans la région trachéo-bronchique) en particulier pour les particules ultrafines déposées (Kreyling & Scheuch, 2000).

Pour un ciblage cellulaire à travers le système sanguin, Longmire et al. et bien d'autres ont publié que pour éviter l'élimination par des organes de clairance (le foie, les reins, la rate), la taille hydrodynamique des NPs (taille combinée du noyau et du revêtement) doit rester faible (Longmire, Choyke, & Kobayashi, 2008). En fait, le RES élimine rapidement des particules supérieures à 100 nm. En outre, la membrane basale des reins présente des pores d'environ 10 nm, de sorte que des particules plus grandes sont filtrées hors du sang. Les SPIONs avec des tailles hydrodynamiques entre 10 et 100 nm montrent une plus grande opportunité d'interagir spécifiquement avec les cellules cibles (Longmire et al., 2008).

Limbach et al. ont étudié l'effet de la taille des particules sur l'internalisation de particules d'oxyde de cérium par des fibroblastes du poumon (Limbach et al., 2005). Leurs résultats ont montré que la taille des particules était le paramètre déterminant majoritairement la quantité internalisée devant la concentration et l'aire spécifique des particules. Les auteurs ont montré que les particules de tailles inférieures à 50 nm s'aggloméraient très vite alors que les particules de 200 nm étaient plus stables dans le milieu de culture. Cette instabilité des particules de petite

taille serait à l'origine, selon les auteurs, de l'internalisation élevée des particules de taille inférieure à 50 nm, comparativement à celles de taille de l'ordre de 200 nm.

Il existe de nombreuses techniques d'analyse qui ont été employées pour mesurer la taille et la distribution de la taille des NPs, telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Lim, Yeap, Che, & Low, 2013) largement utilisée pour la mesure de la taille hydrodynamique, la microscopie électronique à transmission (TEM) (Chatterjee, Haik, & Chen, 2003), la mesure thermomagnétique (DiPietro et al., 2010), la microscopie en champ sombre (Lim, Eggeman, Lanni, Tilton, & Majetich, 2008; Lim et al., 2011), la microscopie à force atomique (AFM) (Silva, Lacava, Buske, Morais, & Azevedo, 2004), et la mesure par spectrométrie acoustique (Dukhin & Goetz, 1996). TEM est l'un des outils d'analyse le plus puissant disponible qui peut donner des informations structurales et la taille directe de la NP. Grâce à l'utilisation de longueurs d'onde courtes, réalisables par des électrons fortement accélérés, il est possible d'étudier la structure de la NP jusqu'au niveau atomique.

2.1.4.2 Effet de la forme des particules

L'effet de la forme des NPs sur leur interaction et internalisation par des cellules macrophagiques a été rapporté pour des NPs de polystyrène micrométriques (Champion & Mitragotri, 2006). La vitesse de phagocytose de particules non sphériques, mais à symétrie cylindrique est déterminée par l'angle tangentiel au point de contact entre la paroi cellulaire et l'axe principal de révolution de la particule. Pour des angles inférieurs à 60 degrés, les particules sont internalisées indépendamment de leur forme alors que pour des angles supérieurs à 60 degrés la cellule s'étale sur la particule sans l'internaliser. Ce résultat montre que c'est la géométrie locale de la particule qui en structurant le réseau d'actine cellulaire détermine si la cellule s'étale sur la particule ou si elle l'internalise micrométriquement (Champion & Mitragotri, 2006).

Muro *et al.* (Muro et al., 2008) ont étudié l'effet de la forme du vecteur (sphérique ou discoïdale) sur son internalisation par les cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro*. Dans cette étude, l'endothélium était ciblé en fonctionnalisant les particules avec un anticorps anti-ICAM qui sont des anticorps capables de se lier à la molécule d'adhérence intercellulaire (ICAM en anglais - Intercellular adhesion molecule). *In vivo*, les vecteurs sphériques de taille micrométrique sont rapidement éliminés du flux sanguin (en moins de 30 min) alors que les particules submicrométriques circulent plus longtemps. Les vecteurs discoïdaux résident plus longtemps

dans le flux sanguin que leurs homologues sphériques et s'accumulent fortement dans les poumons. *In vitro*, les vecteurs sphériques micrométriques sont internalisés plus rapidement que les discoïdaux. Decuzzi *et al* ont montré que l'effet de la géométrie du vecteur sur sa capacité d'internalisation pouvait être expliqué par un modèle mécanique simple prenant en compte l'énergie d'interaction cellule - particule (déterminée par le nombre de sites d'adhésion ligand-récepteur) et l'énergie de déformation de la membrane cellulaire (dont la contribution la plus importante est l'énergie de flexion) (Decuzzi & Ferrari, 2008). Pour des particules cylindriques, les auteurs ont démontré que le paramètre d'asymétrie des particules (le ratio longueur sur largeur) permet de prédire s'il y a internalisation ou pas.

Huang et al. (Kumar, 2000) ont montré que la modification de la forme de NPs poreuses de silice, sans changer les autres caractéristiques telles que la composition chimique, la chimie de surface et de diamètre, produit des résultats différents en ce qui concerne l'internalisation cellulaire et la modulation de la fonction cellulaire. Par conséquent, en forme de tige, ces NPs ont montré l'internalisation cellulaire accrue et donc un plus grand effet sur l'apoptose, la migration et la perturbation de l'organisation du cytosquelette (Kumar, 2000). Ces études pourraient avoir des implications importantes pour la conception de systèmes d'administration de médicaments efficaces et sûrs.

2.1.4.3 Effet de la charge de surface

Le potentiel zêta (ζ) représente la charge de surface que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution. En général, une particule est chargée négativement ou positivement et une couche contre-ions l'entoure. En s'éloignant, dans une couche diffuse, le potentiel varie pour atteindre la neutralité dans la masse de la solution. Il peut être qualitativement décrit comme la nature et le comportement des groupements de surface dans une solution à un certain pH, en présence d'un électrolyte. Sur le plan quantitatif, il peut être mesuré comme un potentiel électrique au niveau du diamètre hydrodynamique de la particule en suspension. Un potentiel zêta élevé (+ ou -) est la valeur d'une indication de la stabilité de la dispersion des NPs en raison de l'interaction électrostatique. Ainsi, on considère qu'une suspension est stable lorsque son $\zeta > |30|$ mV. A l'inverse, au fur et à mesure qu'il diminue en valeur absolue, les particules deviennent de moins en moins chargées et peuvent donc

s'approcher les unes des autres plus étroitement. Cela accroît les probabilités de collision et a donc pour conséquence une perte de stabilité.

Les nanoparticules peuvent présenter des charges de surface variables, avec des conséquences pour les effets biologiques qu'ils induisent. C'est un facteur affectant aussi bien l'interaction avec le milieu physiologique que l'interaction avec les cellules.

La surface des cellules est chargée négativement; ceci est dû entre autre à la présence des protéines protéoglycanes héparan sulfate de charge négative. Les particules positivement chargées auront donc une plus forte affinité pour la membrane cellulaire que leurs homologues neutres ou négativement chargées. Cependant, les résultats concernant l'influence de la charge des NPs sur leur cytotoxicité sont controversés et pas encore totalement clarifiés (Verma & Stellacci, 2010). Par exemple, les NPs d'or (Au) positivement et négativement chargées affichent une toxicité à des concentrations d'au moins 2,5 fois plus faible que les NP neutres (Schaeublin et al., 2011). Calero et al. ont fait une analyse sur la biocompatibilité et l'accumulation des nanoparticules d'oxyde de fer avec trois revêtements différents: aminodextrane (AD), 3-aminopropyltriéthoxysilane (APS) et de l'acide dimercaptosuccinique (DMSA), qui conduisent des particules de charge différente, sur les cellules HeLa. Cette étude a montré que les particules revêtues d'APS, qui sont chargés positivement, sont beaucoup plus internalisées que celles revêtues de DMSA et d'AD par les cellules HeLa (Calero et al., 2014). Kenzaoui et al. ont rapporté que SPIONs revêtues de polyvinylamine, chargées positivement, ont été accumulés beaucoup plus efficacement que les SPIONs revêtues d'acide oléique chargées, négativement, dans deux lignées de cellules du côlon humain (Kenzaoui, Vila, Miquel, Cengelli, & Juillerat-Jeanneret, 2012). Cet effet a été attribué à la charge, plutôt qu'aux groupements chimiques présents, malgré le fait que ces deux facteurs agissent simultanément. Le mécanisme d'internalisation des nanoparticules est aussi affecté par la charge des nanoparticules. Par exemple, les dendrimères positivement chargés et neutres sont internalisés par les cellules épithéliales du poumon par une voie autre que cavéolaire ou clathrine dépendante alors que les dendrimères anioniques pénètrent dans les cellules par la voie cavéolaire (Perumal, Inapagolla, Kannan, & Kannan, 2008).

2.1.4.4 Effet de l'état de dispersion des particules

L'état de dispersion des NPs se réfère au nombre de particules isolées dans un milieu de suspension par rapport aux agglomérées. Plusieurs propriétés environnementales telles que le pH ou la concentration des composants moléculaires peuvent influencer la dispersion. Les agglomérats peuvent être formés directement à partir de forces attractives entre les particules (par exemple, forces de Van der Waals et interactions hydrophobes) ou par l'intermédiaire des liaisons des molécules adsorbées (par exemple, des protéines, des polysaccharides, des polymères). L'agglomération affecte considérablement de nombreux aspects des interactions NPs-cellules. Müller et al ont montré que l'internalisation extensive et la cytotoxicité dose-dépendante des NPs d'hydroxyapatite exposées aux macrophages humains résultent de la formation de larges agglomérats dans un milieu physiologique. L'ajout d'un agent dispersant (dans ce cas le Darvan 7) réduit considérablement la taille moyenne d'agglomérat, la quantité des nanoparticules internalisées et de manière concomitante la cytotoxicité (Muller et al., 2014). Dans le même ordre d'idée, Limbach et ses collaborateurs ont montré que les NPs d'oxydes s'agglomèrent une fois suspendues dans un milieu de culture à moins qu'elles soient fonctionnalisées et que l'internalisation de NPs non agglomérées simples, devient donc très improbable pour celles qui ont moins de 50 nm (Limbach et al., 2005).

L'état de dispersion des NPs est l'une des caractéristiques les plus importantes d'une suspension de NPs, mais elle est l'une des plus difficiles à quantifier. En comparant les changements dans la distribution de taille de particules d'une dispersion "idéale", une évaluation qualitative du degré d'agglomération peut être effectuée. Les mesures de la distribution de la taille sont possibles dans les fluides biologiques simulées, mais il y a peu de techniques disponibles pour mesurer directement la taille des agglomérats dans les cellules ou les tissus vivants. La microscopie post-mortem est la technique principale de l'évaluation qualitative de l'état de dispersion *in vivo*.

2.1.4.5 Effet de la composition chimique et les modifications de surface

Sur les aspects chimiques, des modifications chimiques de surface ont un impact significatif sur la cytotoxicité des SPIONs. Tel qu'indiqué auparavant, les groupements surfaciques influencent la charge. Par exemple, le potentiel cytotoxique et génotoxique des SPIONs revêtues avec différents groupes fonctionnels hydroxyl (-OH), carboxylique (-COOH) et amine (-NH₂), exposées aux fibroblastes L-929, diffèrent.

Les NPs chargées positivement ont montré une génotoxicité dose-dépendante sur les cellules tandis que les NPs nues et celles avec un revêtement hydroxyle n'ont pas causé de génotoxicité évidente à des concentrations comparables (Hong et al., 2011). Les NPs revêtues de polydiméthylamine ont endommagé l'intégrité membranaire et induit la mort cellulaire tandis que les NPs revêtues de l'aminosilane avaient une toxicité beaucoup plus faible et n'ont affectés l'activité métabolique qu'à des concentrations plus élevées. Des NPs revêtues de dextrane ont partiellement altéré la viabilité cellulaire à des concentrations élevées (Rivet, Yuan, Borca-Tasciuc, & Gilbert, 2012). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer comment les modifications de surface affectent la nanotoxicité.

L'une d'elle se base sur la stabilité induite par les différents traitements de surface. En réalité, en dépit du fait que les NPs d'oxyde de fer revêtues de polymères différents sont stables dans l'eau ou dans un tampon PBS, leurs stabilités peuvent varier dans le milieu de culture avec ou sans la présence de sérum.

Une autre hypothèse indique que certains revêtements de surface intermittent exposent le noyau interne, constitué de l'oxyde de fer, au système biologique (Arbab et al., 2005). Les NPs d'oxyde de fer nues sont généralement toxiques en raison de leur surface et de l'hyperactivité ainsi des revêtements de surface appropriés peuvent réduire la toxicité. Par exemple, il a été constaté que le revêtement des SPIONs avec du DMSA a empêché les fibroblastes à avoir des contacts directs avec elle et aucune cytotoxicité n'a été observée avec des concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-1} g / L (Auffan et al., 2006)

Nous notons cependant une certaine contradiction dans la littérature sur la biocompatibilité des SPIONs revêtues ou non. Gupta et al. ont montré que les nanoparticules revêtues de PEG sont biocompatibles puisque les cellules exposées ont présenté une viabilité de 99% par rapport au témoin négatif jusqu'à une concentration supérieure à 1 mg/ml (Gupta, A. K. & Wells, 2004). En plus du PEG, plusieurs groupes ont étudié la cytotoxicité des différentes SPIONs revêtus en surface et ont trouvé un potentiel cytotoxique. Wan et al ont testé les effets de trois revêtements de SPIONs et la cytotoxicité des SPIONs revêtues de Methoxypoly(ethylene glycol)-oligo(acid aspartic) (MPEG-Aspn-NH₂) avaient presque aucune cytotoxicité aux concentrations testées. En comparaison, des SPIONs revêtues de MPEG-PAA- et de PAA réduisent de façon significative la

viabilité des cellules avec seulement 16% des cellules restantes à une concentration de 400 µg/ml (Wang, H. et al., 2007).

Pour l'analyse chimique des NPs, la spectroscopie de photoélectrons X (XPS) et la spectroscopie de masse des ions secondaire (SIMS) sont largement utilisées pour caractériser les NPs ainsi que la corrélation de ces propriétés de surface avec des réactions physiologiques (Ratner, 1996). Ces techniques sont également applicables à l'analyse de la surface de NPs post-exposition aux milieux physiologiques; cependant, le lavage et l'élimination de biomolécules à partir de la surface des particules sont susceptibles d'être une étape nécessaire. Des précautions doivent être prises pour prévenir ou identifier des artefacts de ce processus.

Les propriétés physico-chimiques des NPs jouent un rôle crucial dans leur excellente performance en nanomedecine. Premièrement, les NPs pénètrent facilement dans les tissus et même les cellules, permettant aux cliniciens et aux chercheurs de suivre et de détecter les changements histopathologiques, cellulaires et même moléculaires au cours d'un traitement ou d'un diagnostic (Chen, E., Ruvalcaba, Araujo, Chapman, & Chin, 2008). En plus, les biomarqueurs spécifiques peuvent être liés à la surface des NPs pour un ciblage actif et les nanostructures peuvent être assemblées couche par couche pour la réalisation des nanovecteurs.

La notion de reproductibilité des NPs d'un lot à un autre est généralement basée sur les caractéristiques physico-chimiques telles que la distribution de la taille, les propriétés optiques, les propriétés magnétiques, le diamètre hydrodynamique, le potentiel zêta, la solubilité et le pH. Notre équipe a montré qu'il existe des différences dans la composition chimique de surface des NPs d'un lot à un autre préparé par la même personne, avec le même appareil, en utilisant le même mode opératoire et les réactifs de la même bouteille. En fait, l'analyse de la chimie de surface des NPs d'oxyde fer fonctionnalisé $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ et $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$, a montré la scission de la liaison Si-O et l'oxydation des groupes NH_n dans certaines lot de NPs, ce qui marque des variations d'un lot à un autre (Franca, Zhang, Veres, Yahia, & Sacher, 2013a). Les procédés de production de médicaments doivent être contrôlés et reproductibles afin de s'assurer que les nanomatériaux contenus dans le dispositif médical sont rigoureusement identiques. C'est la seule façon de s'assurer que l'évaluation du risque biologique ensuite effectuée sur le dispositif médical contenant des nanomatériaux est valable pour tous les lots produits.

2.2 Réponses biologiques aux nanoparticules

2.2.1 Paramètres physico-chimiques déterminant l'interaction particule–milieu physiologique

Lorsque les nanoparticules entrent en contact avec des systèmes biologiques, une nano-bio-interface est générée. Cette interface comprend les interactions dynamiques physico-chimiques, les échanges thermodynamique cinétique entre les surfaces des nanoparticules et des composants biologiques comme les protéines et des phospholipides (Lynch, Salvati, & Dawson, 2009; Nel, A. E. et al., 2009). L'interface solide-liquide est un élément clé dans les interactions nanoparticules-cellules, mais une compréhension de cette interface fait défaut. C'est la quantité et la conformation des biomolécules sur la surface plutôt que les particules elles-mêmes qui sont suggérées d'être la cause de nombreuses réactions biologiques (Lynch et al., 2009). En d'autres termes, il s'agit de la couche externe de biomolécules qui est 'vue' par les cellules, et conduit à l'interaction des particules avec la cellule.

Les biomolécules les plus abondantes qui interagissent avec des NPs dans des milieux biologiques sont des protéines (Lynch et al., 2009). Il y a des études qui ont caractérisé et identifié les protéines adsorbées sur les biomatériaux en général et dans notre cas les NPs que l'on appelle 'corona'. L'adsorption des protéines sur les NPs n'est pas un processus statique, mais plutôt un échange dynamique des protéines adsorbées avec l'environnement biologique.

Les protéines sont des polypeptides ayant une conformation définie et donc la charge de surface dépend du pH et du milieu environnant. L'adsorption des protéines à la surface des NPs est favorisée par plusieurs forces telles que des liaisons hydrogène, les forces de Van der Waals, etc. La formation générale du complexe NPs - protéine est un processus multifactoriel et ne dépend pas seulement des caractéristiques des NPs, mais également des protéines interagissant et du milieu environnemental. L'adsorption des protéines sur les NPs est une adsorption multi-protéique définie par 'l'effet Vroman'. L'effet Vroman décrit que dans un mélange complexe de protéines, leur adsorption implique généralement une série d'étapes d'adsorption et de désorption dans lequel les protéines de faible poids moléculaire ou à forte concentration sont d'abord adsorbées et ensuite déplacées par les protéines ayant une plus grande affinité avec la surface (Scott, 1991). Les taux d'adsorption et de désorption spécifiques pour chaque protéine décident

de la longévité de leur interaction avec la surface des NPs. La liaison irréversible (ou au moins à long terme) des protéines sur la NP conduit à la formation du "hard corona", tandis que la liaison réversible de protéines avec des taux d'adsorption et de désorption rapides définit le "soft corona" (Cedervall, Lynch, Foy, et al., 2007; Landsiedel et al., 2010). Le groupe du professeur Dawson a introduit le concept du 'hard corona' en 2002 (Lynch et al., 2007). Dans leurs publications les plus récentes, Milani et al. (Milani, Bombelli, Pitek, Dawson, & Radler, 2012) ont démontré que le corona peut être composée de différentes couches de protéines, la première couche étant fixée de façon irréversible ('hard corona'), tandis que les couches externes (soft corona) sont moins fortement fixées et susceptibles à interchanger de façon réversible avec d'autres molécules en solution qui sont en compétition. La composition des NPs (Sohaebuddin, Thevenot, Baker, Eaton, & Tang, 2010) la présence de groupes fonctionnels spécifiques (Blanco, Horton, & Mesquida, 2008; Hagiwara, Sakiyama, & Watanabe, 2009; Skepo, 2008), le pH (Rabe, Verdes, & Seeger, 2011), la température (Malmsten, 1998) et l'hydrophobicité (Arima & Iwata, 2007; Cha, Krishnan, Fiore, & Vogler, 2008) sont des facteurs qui influencent l'adsorption des protéines sur la surface des NPs. La forme des NPs (Sela, Badihi, Rosen, Steinberg, & Kohavi, 2007; Sousa, Manuela Bras, Moradas-Ferreira, & Barbosa, 2007) est également importante en ce qui concerne l'adsorption des protéines. Cela a été confirmé pour les nano tiges et les nanotubes de TiO₂ qui ont adsorbé de façon différentielle des protéines plasmatiques (Deng et al., 2009). De même, la modification de la charge de surface des nanoparticules peut également influencer sur l'adsorption des protéines. Des études ont démontré que les surfaces de nanoparticules de charge neutre adsorbent moins de protéines que leur homologue de charge négative (COOH) ou de charge positive (NH₂) (Deng, Liang, Toth, Monteiro, & Minchin, 2013; Fertsch-Gapp, Semmler-Behnke, Wenk, & Kreyling, 2011). Pour éviter l'agglomération des NPs, des milieux de dispersion contenant des protéines, comme le sérum, le liquide pulmonaire alvéolaire (Saptarshi, Duschl, & Lopata, 2013) sont utilisés.

Pour caractériser les protéines adsorbées à la surface des nanomatériaux, des technologies telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie électronique à transmission (MET), le dichroïsme circulaire (CD), la chromatographie, la calorimétrie de titration isotherme (ITC) et la résonance plasmonique de surface (SPR) et la spectrométrie de masse (MS) ont été effectués pour déterminer l'épaisseur, la densité, la disposition, la conformation, l'affinité et l'identification de protéines sur les nanoparticules. Malgré des progrès considérables dans ce

domaine, il y a encore des opinions très différentes et même contradictoire sur la compréhension du processus de formation du corona. D'une part, un groupe de chercheurs choisit de ne mesurer que le hard corona après l'application d'un protocole avec rinçage. L'adsorption est donc définie ici comme un processus irréversible où les protéines sont fortement liées à la surface de la NP. La fraction de protéine faiblement liée est jugée peu importante et éliminée par rinçage. D'autre part, le second groupe de chercheurs définit la formation du corona à deux niveaux, le hard corona et le soft corona (Vogler, 2012).

2.2.2 Stabilité et dégradation des NPs fonctionnalisées

Les nanoparticules sont généralement chargées électriquement grâce au revêtement de surface pour atteindre leur stabilité colloïdale dans des solutions par les forces de répulsion électrostatiques. Cependant, les nanoparticules stabilisées électrostatiquement sont sujettes à l'aggrégation dans un milieu biologique en raison de la neutralisation de la charge de surface par des espèces ioniques présentes dans le milieu. Dans certains cas, une aggrégation indésirable peut diminuer la stabilité des NPs conduisant à des agglomérations qui sont indésirables pour une application médicale à long terme. En plus, les nanoparticules chargées ont tendance à adsorber les protéines dans les milieux biologiques grâce à l'interaction électrostatique. L'adsorption de ces protéines aux NPs conduit à une augmentation progressive de la taille des particules et, éventuellement, à leur précipitation.

En ce qui concerne la dégradation des SPIONs, le résultat à long terme des NPs dans l'organisme est une des préoccupations les plus importantes soulevées par le développement de la nanotechnologie et de la nanomédecine. On a très peu d'information sur les mécanismes utilisés par les cellules pour traiter et dégrader les NPs au fil du temps. Dans ce contexte, les SPIONs bénéficient d'un statut privilégié, parce qu'ils montrent un très bon profil de tolérance, ce qui permet leur utilisation clinique pour le diagnostic par l'imagerie par résonance magnétique. Il est généralement admis que le métabolisme qui régule le fer dans l'organisme peut également gérer des NPs d'oxyde de fer. Cependant la biotransformation de NPs d'oxyde de fer n'est toujours pas élucidé. Levy et ses collaborateurs ont mis en évidence la biotransformation de SPIONs probablement stockées en protéines ferritine sur une période de trois mois (Mejias et al., 2013).

Par ailleurs, la dégradation de l'oxyde de fer en ions libres dans des environnements physiologiques (Shubayev, Pisanic, & Jin, 2009) a été signalé d'augmenter la production de

radicaux libres dans les cellules et causent des dommages qui peuvent provoquer la mort cellulaire (Hoskins, Wang, Cheng, & Cuschieri, 2012; Minotti & Aust, 1987).

La stabilité à long terme doit être étudiée en profondeur afin d'éviter la dégradation de l'oxyde de fer en radicaux libres et l'agglomération des particules magnétique provoquant de défis de formulation.

2.2.3 Réponse cellulaire aux SPIONs

Le mécanisme de cytotoxicité des SPIONs est attribué à leur internalisation dans les cellules et à la production des espèces réactives d'oxygène (ROS).

2.2.3.1 Internalisation

La phagocytose est reconnue comme un processus important dans l'internalisation des NPs dans les cellules (Conner & Schmid, 2003). Cependant, d'autres mécanismes sont aussi responsables de l'internalisation des métaux, des oxydes métalliques, ou d'autres systèmes de taille nanométrique par la cellule (Limbach et al., 2007), et pour les différentes réactions biologiques qui peuvent suivre. Bien que les particules de diamètre inférieur à 100 nm soient capables de pénétrer dans la cellule par presque n'importe quel trajet de transport de vésicule (Geiser et al., 2005), d'autres options sont à considérer, par exemple le transport des nanomatériaux manufacturés dans les cellules grâce aux récepteurs (Dobrovolskaia & Mcneil, 2007) ou encore par " diffusion " à travers le membrane plasmique, qui est considérée comme une interaction adhésive (Geiser et al., 2005).

2.2.3.2 Espèces réactives d'oxygène et stress oxydatif

L'oxygène est un gaz nécessaire à tous les animaux, les plantes et les bactéries pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celle existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes. L'utilisation de l'oxygène engendre la production métabolites réduits que sont le radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . La toxicité du peroxyde d'hydrogène provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $\cdot OH$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} ou Cu^+ .

Ces trois molécules sont formées selon un ordre bien précis. Tout d'abord, les $O_2^{\cdot -}$ sont produits suite à une réduction de l'oxygène (O_2), principalement causée par des électrons s'étant échappés du système de transport d'électrons présent dans la mitochondrie (Ishii, 2007). Le $O_2^{\cdot -}$ est d'une importance capitale car il est la première espèce réactive d'oxygène à être formée. Certains complexes ont été identifiés comme sites de production possible d' $O_2^{\cdot -}$ dans la mitochondrie, et l'importance physiologique commence à être déterminée. En effet, comparativement aux complexes III et IV, une inhibition de seulement 25 % du complexe I (NADH ubiquinone oxydoréductase) est suffisante pour provoquer une formation d'espèces réactives ce qui peut théoriquement avoir des conséquences physiologiques (Adam-Vizi, 2005). Les $O_2^{\cdot -}$ agissent en oxydant certains cofacteurs comme, par exemple, le groupement Fe-S de l'aconitase qui est une enzyme du cycle de Krebs (Ilbert, Graf, & Jakob, 2006). Ils inhibent donc la production d'ATP cellulaire. De plus, en présence d'oxyde nitrique (NO), ils provoquent la formation d'une espèce réactive de l'azote, l'oxynitrite ($OONO^{\cdot -}$) qui est bien plus réactive que les $O_2^{\cdot -}$ et qui peut endommager de très nombreuses molécules (Murphy, 1999).

Cet $O_2^{\cdot -}$ est transformé par la SOD en deux étapes. Premièrement, le métal constituant du site actif de l'enzyme (soit Fe^{3+} , Cu^{2+} ou Mn^{3+}) est réduit en transformant un $O_2^{\cdot -}$ en O_2 , et ensuite ce métal est oxydé en présence de deux protons, transformant un second $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 (Johnson & Giulivi, 2005). Le H_2O_2 oxyde les groupements thiols des résidus cystéines (Ilbert et al., 2006). Il est à noter que le H_2O_2 peut diffuser à travers la membrane cellulaire (Afonso, Champy, Mitrovic, Collin, & Lomri, 2007).

Le OH^{\cdot} n'est pas spécifique et est l'espèce réactive d'oxygène (ROS) la plus dangereuse et la plus réactive (Shi, Sui, Wang, Luo, & Ji, 2005). En effet, il réagit très rapidement avec son environnement, sa demi-vie étant de 10^{-9} seconde, en comparaison, le $O_2^{\cdot -}$ et le H_2O_2 sont beaucoup plus stables (Bossé Y, Joannis DR, & MR., 2003). Les OH^{\cdot} sont produits par la réaction de Fenton qui est une réaction de dismutation se produisant en présence de certains métaux possédant deux états de transition différents (Ullrich & Kissner, 2006). Le métal doit donc être sous sa forme oxydée pour catalyser cette réaction.

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée. C'est ainsi que dans l'athérosclérose, le rôle des ROS apparaît

comme majeur, validant la « théorie oxydative de l'athérosclérose » proposée par Steinberg et al (Steinberg, Parthasarathy, Carew, Khoo, & Witztum, 1989) et rejoignant la théorie inflammatoire. Les ROS produites par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les monocytes-macrophages, sont susceptibles d'oxyder les lipoprotéines de basse densité (LDL), conduisant à la formation de stries lipidiques, première étape dans l'apparition de la plaque d'athérome (épaississement des artères par un dépôt composé, en partie, d'esters de cholestérol). De même, dans le diabète sucré, le stress oxydant provoqué par les concentrations anormalement élevées de glucose dans l'organisme joue un rôle très important dans la survenue des complications diabétiques (Bonnetfont-Rousselot, 2002). Les ROS seraient également impliquées dans les maladies neurodégénératives à début tardif, notamment la maladie d'Alzheimer (Klein, J. A. & Ackerman, 2003), la maladie de Parkinson en relation à la fois avec un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées par le protéasome (Jenner, 2003), la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, (Migliore & Coppede, 2002).

Les cellules maintiennent un état d'oxydation homéostatique et équilibré, le stress oxydatif induit par les stimuli externes est contrôlé par le biais de plusieurs mécanismes de régulation. Lorsque ces mécanismes de régulation sont défaillants, les ROS excessives ou les espèces réactives d'azote (RNS) peuvent endommager les composants cellulaires, affecter la fonction des biomolécules, et finalement induire la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. Les NPs sont susceptibles d'affecter l'état d'oxydation cellulaire de diverses manières. La génération de ROS et le dommage oxydatif dans les cellules sont considérés comme des facteurs importants de la cytotoxicité induite par NPs.

En raison du grand rapport surface/volume des NPs, plus de groupes réactifs sont situés sur la surface et peuvent être disponibles pour un transfert d'électrons à l'oxygène, formant ainsi le superoxide, un autre précurseur de ROS (Nel, A., Xia, Madler, & Li, 2006). Les ROS peuvent également être générés à la suite d'interactions cellules-NPs, même en l'absence de groupes réactifs sur la surface (Xia, T. et al., 2006).

Une augmentation de la production de ROS ou une protection défaillante peut entraîner des effets pro-inflammatoires et cytotoxiques. Les effets pro-inflammatoires comprennent l'expression des

cytokines, des chimiokines, tandis que les effets cytotoxiques comprennent les mitochondries qui peuvent libérer des facteurs pro-apoptotiques et induire l'apoptose.

Les NPs peuvent induire un stress oxydant par plusieurs voies. Par exemple, la production de l'anion superoxyde (O_2^-) et du radical hydroxyle (OH^\cdot) peut résulter de l'absence d'électron provoqué par une photoactivation de TiO_2 ou du saut d'électron de la bande de conduction d'une NP semi-conductrice. En plus, la présence de métaux de transition tels que Fe, Ni, Cu, Co et Cr sur la surface de la NP peut générer l'anion superoxyde via la réaction de Fenton. Enfin, même les NPs inertes peuvent donner lieu à la production de ROS par leur dépôt dans les mitochondries et la perturbation de leur fonction (Li & Huang, 2008).

Beaucoup d'études *in vitro* portent sur des tests de mesure des marqueurs du stress oxydatif. Les deux dosages les plus couramment utilisés sont la mesure de la production de ROS intracellulaire et la réduction du glutathion (GSH). Les ROS sont le plus souvent mesurées au moyen d'un essai fluorométrique basée sur l'oxydation intracellulaire de 2,7-dichloro diacétate ($H_2DCF-DA$). Il existe d'autres méthodes plus couteuses puisqu'elles sont plus spécifiques à un type de ROS. C'est l'exemple du 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF) utilisé pour la détection de l'anion superoxyde (O_2^-). Le GSH, quant à lui, est mesuré avec des essais basés sur la production d'un colorant fluorescent ou coloré par réaction avec le GSH. Les résultats des analyses des ROS et du GSH présentent une corrélation remarquable (Carlson et al., 2008).

2.2.3.3 Evaluation de la cytotoxicité

La première étape vers la compréhension de l'interaction biomatériaux – tissus ou cellules implique souvent des études *in vitro*. Par rapport aux études *in vivo*, les études *in vitro* sont éthiquement moins ambiguës, plus faciles à contrôler et à reproduire et moins chères. Dans le cas de la cytotoxicité, il est important de reconnaître que les cultures cellulaires sont sensibles à des changements environnementaux tels la température, le pH, les concentrations en éléments nutritifs et en déchets, en plus de la concentration de l'agent potentiellement toxique à tester. Par conséquent, le contrôle des conditions expérimentales est crucial pour s'assurer que la mortalité cellulaire correspond à la toxicité des NPs et non à l'instabilité des conditions de culture cellulaire. En plus, puisque les NPs peuvent adsorber des colorants et produire des ROS, il est important que le test de cytotoxicité choisi soit approprié. Il faut également mener plusieurs essais pour assurer des conclusions valides (Lewinski, Colvin, & Drezek, 2008).

L'apoptose est probablement l'un des principaux mécanismes de la toxicité cellulaire induite par des composés cytotoxiques (Nagami, Kawashima, Kuno, Kemi, & Matsumoto, 2002). L'apoptose est un processus de mort cellulaire physiologique programmé qui permet à l'organisme d'éliminer les cellules non désirées ou endommagées. Elle joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre contrôlé entre la prolifération et la mort cellulaire (Wyllie, 1987).

L'apoptose est contrôlé génétiquement et activé par des stimuli physiologiques normaux, intra ou extracellulaires mais également par des stimuli pathologiques qui portent atteinte au bon fonctionnement de la cellule tels que, par exemple, une infection, un choc thermique, un stress oxydatif ou des dommages induits à l'ADN.

La mort cellulaire par apoptose est caractérisée par des altérations morphologiques spécifiques, entre autre une réduction du volume cytoplasmique, la condensation de la chromatine au niveau de la membrane nucléaire, une perte d'asymétrie de la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN. La cellule entière finit par être démantelée sous forme de vésicules appelées corps apoptotiques qui contiennent le cytoplasme, les organelles cellulaires ainsi que la chromatine fragmentée. Pendant que les cellules nécrotiques déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire, les cellules en apoptose sont reconnues et phagocytées par les cellules avoisinantes sans susciter de réaction inflammatoire (Savill, 1998).

L'apoptose est également caractérisée par des dégradations biochimiques majeures. Parmi elles, on peut observer une perte des fonctions mitochondriales, la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux tels que le cytochrome c ou l'AIF (apoptosis inducing factor) et enfin, l'activation des caspases et la protéolyse de substrats cellulaires spécifiques (Nicholson, 1999).

Le test de cytotoxicité le plus simple consiste à inspecter visuellement des cellules par microscopie pour observer des changements sur la morphologie cellulaire ou nucléaire. Fiorito et al. ont utilisé cette technique lors de l'évaluation de la cytotoxicité des nanotubes de carbone monoparoï (SWNTs) (Fiorito, Serafino, Andreola, & Bernier, 2006). Cependant, la plupart des essais de cytotoxicité utilisés mesure la viabilité cellulaire par des méthodes colorimétriques. Ces méthodes colorimétriques peuvent mesurer l'intégrité de la membrane plasmique, l'activité mitochondriale, le métabolisme cellulaire, la réponse pro-inflammatoire.

2.2.3.3.1 *Rupture membranaire induite par les nanoparticules*

L'internalisation des NPs dans la cellule implique probablement plusieurs interactions électrostatiques des NPs chargées avec les groupements chimiques à la surface de la membrane cellulaire qui peuvent altérer cette dernière. L'internalisation de ces NPs chargées dans le cytoplasme provoque la formation de pores entre 1 à 100 ms, suivie d'une nouvelle fermeture lente en quelques dizaines de secondes (Chen, Z. P., Xu, Zhang, & Gu, 2009). Les interactions entre les NPs chargées avec la membrane cellulaire provoquent également sa dépolarisation et la perturbation de son potentiel. En outre, une augmentation de l'ion calcium [Ca^{2+}] inhibe la prolifération cellulaire (Arvizo et al., 2010). La forme des NPs peut également jouer un rôle dans la rupture membranaire. Les NPs en forme d'aiguille, plutôt que de sphère ou les NPs plates, provoquent une perturbation temporaire de la membrane cellulaire endothéliale (Doshi & Mitragotri, 2010). En élargissant notre compréhension des divers mécanismes des interactions entre les NPs et la membrane cellulaire, la réduction de la rupture membranaire sera atteinte grâce à la régulation de la taille, la forme, la charge de surface et la chimie de surface.

2.2.3.3.2 *Altérations du cytosquelette par des nanoparticules*

Le cytosquelette maintient la forme de la cellule et joue un rôle important dans le transport intracellulaire, la génération de la force, la motilité et la division cellulaire (Alberts et al., 2007). L'internalisation des NPs entraîne des modifications directes ou indirectes du cytosquelette. La perte de la fonction appropriée du cytosquelette provoque une réduction de la motilité, la division et la prolifération des cellules (Holt et al., 2010; Soenen, S. J. H., Nuytten, De Meyer, De Smedt, & De Cuyper, 2010). Des concentrations élevées de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées affectent le cytosquelette et la maturation cellulaire (Soenen, S. J. H. et al., 2010).

2.2.3.3.3 *Altérations mitochondriales par des nanoparticules*

Les mitochondries servent de " centrales électriques cellulaires " qui fournissent de l'énergie chimique (ATP) aux cellules (Alberts et al., 2007). Ils sont également impliqués dans une série d'autres processus, tels que la signalisation et la différenciation cellulaire. Les NPs en interaction avec la mitochondrie, peuvent affecter leurs fonctions (Karatas, Sezgin, Aydin, & Culha, 2009; Pan et al., 2009). Les NPs peuvent se lier à des protéines, des lipides et des glucides présents sur

la membrane mitochondriale dans les cellules vivantes. Les NPs peuvent également causer des dommages indirects en augmentant la perméabilité de la membrane mitochondriale interne grâce à la génération d'un stress oxydatif (Pan et al., 2009).

2.2.3.3.4 Altérations du noyau cellulaire par des nanoparticules

Le noyau maintient l'intégrité des gènes et contrôle les activités cellulaires en régulant les expressions génétiques. Les structures nucléaires comprennent l'enveloppe nucléaire, qui se compose d'une bicouche lipidique, la lumière nucléaire, qui se compose de filaments intermédiaires et des protéines membranaires, les chromosomes, qui comprennent de l'ADN et des histones, et le nucléole, qui se compose d'ARNr, ADNr, et des protéines (Seib, Jones, Rnjak-Kovacina, Lin, & Kaplan, 2013). Puisque l'enveloppe nucléaire empêche de nombreuses macromolécules de pénétrer dans le noyau, l'entrée des NPs dans le noyau est limitée à moins qu'elles soient de très petites tailles (<5 nm) ou conçues avec des molécules ciblant le noyau (Conroy et al., 2008).

2.2.3.3.5 Réponse inflammatoire

Les marqueurs *in vitro* de l'inflammation principalement rencontrés dans la recherche en nanotoxicologie sont le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), les protéines inhibitrices de macrophages (MIP-2) et les interleukines, le plus souvent mesurés par méthode immuno-enzymatique ELISA. Un accord raisonnable dans les résultats de plusieurs marqueurs de l'inflammation ont été trouvés (Carlson et al., 2008), même si de grandes disparités ont également été rapportés (Sayes, Reed, & Warheit, 2007). On ne sait pas quel type de cytokines sont les plus pertinentes à étudier après l'exposition des cellules aux NPs, bien que le type de cellule utilisé joue probablement un rôle important. En général, les raisons de la sélection des types de cytokines inclus dans les études ne sont pas rapportées.

CHAPITRE 3 OBJECTIFS, APPROCHE ET HYPOTHÈSE

3.1 Contexte de l'étude

Notre projet consiste à développer un nano-vecteur capable de mener des substances thérapeutiques, tels que le monoxyde d'azote (NO), jusqu'à la paroi alvéolaire. Ce projet comporte 3 principaux volets à savoir :

- La synthèse et la fonctionnalisations des SPIONs;
- La caractérisation des propriétés physico-chimiques de ces SPIONs;
- La biocompatibilité de ces SPIONs à chaque étape de la fonctionnalisation, i.e., d'une part évaluer l'effet des SPIONs sur le système biologique et d'autre part évaluer l'effet du système physiologique sur les SPIONs.

Ce troisième volet fait l'objet de cette thèse. Les méthodes d'évaluations actuelles de la biocompatibilité instaurées par l'organisation internationale de normalisation (ISO) sont celles établies pour les biomatériaux à l'échelle macrométrique. Ces méthodes sont adaptées aux nanomatériaux parce qu'actuellement, il n'existe aucune réglementation internationale ou nationale appliquée spécifiquement aux nanomatériaux. Malheureusement, certaines d'entre elles induisent des interférences qui pourraient conduire aux fausses interprétations. Les normes d'évaluation des nanomatériaux pour une homologation auprès d'une institution réglementaire comme santé Canada ou l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux - FDA (Food and Drug Administration) sont choisies au cas par cas. Toutes ces raisons nous ont amené à élaborer et à optimiser nos protocoles de cytotoxicité pour l'évaluation de l'effet des SPIONs sur le système biologique et les protocoles de caractérisation physico-chimique pour l'évaluation de l'effet du système physiologique sur les SPIONs.

3.2 Objectif général

La biocompatibilité est la capacité d'un biomatériau à remplir une fonction spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte. A chaque étape de la fonctionnalisation de nos SPIONs, nous allons évaluer, d'une part, l'effet du système physiologique sur les SPIONs (exemple : l'adsorption des protéines, la production des espèces réactives d'oxygènes, l'agglomération, etc) et d'autre part,

l'effet des SPIONs sur le système biologique (exemple : la cytotoxicité). Puisque la notion de biocompatibilité implique plusieurs phénomènes interliés, nous avons choisi comme objectif principal de:

Comprendre le mécanisme d'adsorption des protéines à la surface des NPs et établir une corrélation entre les caractéristiques physico-chimiques de ces NPs et leur biocompatibilité.

3.3 Objectifs spécifiques

- 3.3.1 Élaborer les protocoles des tests de cytotoxicité en tenant compte des influences des paramètres physico-chimiques des NPs.
- 3.3.2 Identifier les paramètres biologiques, liés aux milieux de culture, qui influencent le potentiel cytotoxique des NPs
- 3.3.3 Identifier les caractéristiques des protéines adsorbées à la surface des NPs qui influencent la biocompatibilité.

3.4 Approche et Hypothèse

Pour mieux définir les interactions entre les NPs et les milieux de culture, la recherche présentée ici programme l'utilisation des NPs d'oxyde de fer avec différentes fonctionnalisations en contact avec des milieux physiologiques de composition variable comme des modèles pour identifier et clarifier les interactions des NPs lors de l'exposition cellulaire *in vitro*.

3.4.1 Contrôle du milieu de culture

Nous croyons que les composants d'un milieu de culture influencent les réponses cellulaires.

Les milieux physiologiques choisis sont des milieux de culture favorables pour la culture des cellules épithéliales alvéolaires à savoir : Dulbecco's Modified Eagle Medium (**DMEM**), Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (**F-12K Medium**) et le Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (**DMEM/F12**) avec des suppléments d'origine animal (Fetal bovine serum) et d'origine chimique (Serum-Free Cell Culture Supplement Kit).

3.4.2 Caractérisation des principales propriétés physico-chimiques des NPs avant et après l'incubation dans le milieu de culture cellulaire.

Lors de la première partie de l'étude, nous avons utilisé quatre types de NPs : la magnétite (Fe_3O_4), la magnétite recouverte d'acide oléique ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$), la magnétite avec un revêtement de silicium ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$) et la magnétite avec un premier revêtement de silicium et deuxième revêtement de groupement amine ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2@\text{NH}_2$).

Lors de la deuxième partie de l'étude, nous avons utilisé un seul type de NP (Fe_3O_4).

A la troisième partie, nous avons utilisé trois types de NP : la magnétite (Fe_3O_4), la magnétite revêtue de groupement amine ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$) et la magnétite revêtue groupement carboxylique ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$).

Nous avons réalisé la caractérisation de nos NPs avant l'incubation dans le milieu de culture afin de confirmer leurs propriétés principales susceptibles d'influencer la biocompatibilité : la composition chimique de surface, la taille, la forme, la charge de surface, la cristallinité.

La caractérisation des principales propriétés physico-chimiques des NPs après l'incubation dans le milieu de culture nous permet de quantifier et d'identifier le corona et son évolution dans le temps.

3.4.3 Analyse des corrélations

Les résultats obtenus des tests de biocompatibilité, de caractérisation des NPs avant et après incubation avec les milieux de culture seront analysés et interprétés pour établir des corrélations, tout ceci pour tester l'hypothèse suivante : **la corrélation entre les caractéristiques physico-chimiques de surface des SPIONs et l'identité des protéines adsorbées sur ces dernières dans un milieu physiologique permettra de prédire la réponse des cellules exposées.**

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: IN VITRO BIOCOMPATIBILITY ASSESSMENT OF FUNCTIONALIZED MAGNETITE NANOPARTICLES: BIOLOGICAL AND CYTOTOXICOLOGICAL EFFECTS

D. A. Mbeh¹, R. França¹, Y. Merhi², X. F. Zhang³, T. Veres³, E. Sacher^{1,4}, L. Yahia¹

¹Laboratory for Innovation and Analysis of Bio-Performance, École Polytechnique, C.P. 5079, Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

²Montreal Heart Institute, 5000 rue Belanger, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8

³Institut des Matériaux Industriels, 75 de Mortagne, Boucherville, Qc, Canada J4B 6Y4

⁴Regroupement Québécois de Matériaux de Pointe, École Polytechnique, C.P. 5079, Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

Published in the Journal of Biomedical Materials Research A - 2012 Jun; 100(6):1637-46

4.1 Abstract

In the biomedical field, nanomaterials have the potential for use in the targeted delivery of drugs in the human body and in the diagnosis and therapy of certain diseases. In the category of targeted delivery, magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles have received much attention. As with any similar new therapy, when such nanoparticles are functionalized with chemical groups designed to permit the specific attachment of drugs, cytotoxicological testing is necessary before moving to animal models. Here, we consider several variously functionalized magnetite nanoparticles, including those prepared with (1) a monolayer of oleic acid ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@OA}$), which is subsequently converted to (2) a shell of amine-containing silane ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@NH}_2$), (3) a shell of silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$), and (4) a shell of amine-containing silane over a shell of silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{@NH}_2$). These latter three functionalities were evaluated for biocompatibility,

cellular morphology, mitochondrial function (MTT assay), lactate dehydrogenase membrane leakage (LDH assay), and proinflammatory potential through enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for interleukin 6 (IL-6). Controlled tests were performed over a period of 72 h, with results showing LDH leakage and abnormal IL-6 secretion at high concentrations (>50 $\mu\text{g/mL}$). The tests showed that, in addition to the surface characteristics of the nanoparticles, both the nutrient medium and the time of suspension before exposure to cells also contribute to nanoparticle cytotoxicity.

4.2 Introduction

In recent years, the growth of nanotechnology has animated many scientific debates, whose points of view may appear contradictory. For example, research suggests many advantages, for both the wellbeing of man and assured future manufacturing growth, through the comprehension and control of the functionalization of nanoparticles (NPs) (Linazasoro, 2008; Sahoo, Parveen, & Panda, 2007). However, enthusiasm for this nanotechnology raises the question of both toxicological and environmental impacts. In the biomedical field, several areas are represented, such as nanosurgery, in which NPs are used as nano-heaters to burn malignant cells (Singh, N., Jenkins, Asadi, & Doak, 2010), nano-vectors, in which NPs are used as drug delivery agents to a target site, and nano-tracers, in which NPs are used for diagnosis through medical imagery (Na, Song, & Hyeon, 2009). Magnetite (Fe_3O_4) NPs offer many potential applications to these fields: they are superparamagnetic (i.e., they exhibit magnetic behavior in the presence of magnetic fields), they are MRI-detectable, with specific microfabrication increasing their magnetic resonance imaging (MRI) sensitivities, their surfaces may be functionalized to act as drug receptors, and their temperatures may be raised in alternating magnetic fields (Zabow, Dodd, Moreland, & Koretsky, 2008).

As the use of NPs increases, with new nanotechnologically applicable materials emerging, hazard identification becomes critical. In vitro studies will play an essential role, because they can provide high-throughput systems for the rapid and cost-effective screening of hazards. Therefore, reliable in vitro studies that generate comprehensible results are needed.

Our ultimate purpose is to functionalize magnetite NPs for magnetic targeting. This is because, with untargeted intravenous administration, the quantity of potentially toxic drug administered is

necessarily high, so as to overcome dilution and losses through the liver, kidney, etc. The use of magnetic targeting is beneficial, in that it reduces both the amount of drug used and the resultant toxicity.

The NPs used in this study are composed of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) cores, surrounded by several different shells, including (1) a monolayer of oleic acid ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@OA}$), (2) a shell of amine-containing silane ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@NH}_2$), (3) a shell of silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$), and (4) a shell of amine-containing silane over a shell of silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{@NH}_2$). The @OA is used in the general preparation of the latter three NPs, while the @NH₂, @SiO₂, and @SiO₂@NH₂ are intended to provide test structures for further functionalization with drugs.

When NPs are functionalized, changes occur in their physicochemical properties such as size, shape, and surface reactivity, which can cause changes in biological responses (Park et al., 2009). Currently, knowledge of the toxicity of manufactured NPs remains limited, with often contradictory results from different laboratories, even when using the same NPs (Suh, Suslick, Stucky, & Suh, 2009). Beyond basic NP behavior, new parameters, such as the characteristics of the surrounding environment (e.g., the composition of the culture medium, the pH value, the presence and types of proteins) contribute to the ambiguity of cell interactions in solution (Maiorano et al., 2010). For example, NPs suspended in culture media are known to adsorb a set of diverse proteins and form a protein corona, whose composition depends on the proteins present, and their resultant epitopes on reaction with the NPs, as well as on the surface characteristics, size, and concentration of the NPs (Cedervall, Lynch, Lindman, et al., 2007). It is important to understand how these engineered NPs interact with living systems, from the moment of first contact and the onset of interactions induced by their presence.

Traditionally, *in vitro* toxicity testing focuses on whether or not exposure to a potentially toxic agent results in cell death. However, even when no cell damage or death may be apparent after NP exposure, changes in cellular function may result. Therefore, it is important to verify that the end points chosen to signify cytotoxicity are appropriate. We assess the toxicities of our NPs through changes in cellular morphology, mitochondrial function, membrane leakage by LDH, and IL-6 production (Unfried et al., 2007).

Klaine et al. (Klaine et al., 2008) proposed that the activation of intracellular oxidative stress appears to provoke the toxicity mechanisms of many nanomaterials. As soon as the nanomaterial enters the cell, it may induce intracellular oxidative stress by disturbing the balance between oxidant and anti-oxidant processes. For biomedical applications, when choosing the nanomaterial, its surface chemistry must be evaluated, so that both the cytotoxic effects and the possible control of pro-inflammatory cytokines may be taken into account. To identify systemic inflammatory responses, one may choose to measure immune system proteins, such as pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, and tumor necrosis factor- α TNF- α), Th1-type cytokines (IL-12 and Interferon- γ IFN- γ), and Th2-type cytokines (IL-4, IL-5, and IL-10) among others. In our study, we chose to quantify IL-6 because we use cell line A549, which are epithelial cells that secrete IL-6 in response to stress.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Nanoparticles

4.3.1.1 Materials

Oleic acid (OA, 90%), 1-hexanol (99%), octyl ether (98%), ammonia solution (NH₄OH, 28–30 wt % in water), Triton X-100, hexane (95%), cyclohexane (99.5%), and tetraethoxysilane (TEOS, 99.999%) were purchased from Sigma-Aldrich. Iron pentacarbonyl (99.5%) was purchased from Strem Chemicals. N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl trimethoxysilane (AEAP3, ~ 90%) was purchased from Gelest.

4.3.1.2 Synthesis of Fe₃O₄@NH₂ NPs

Oleic acid-coated Fe₃O₄ NPs (Fe₃O₄@OA) were synthesized using a thermal decomposition process (Zhang, X. F. et al., 2011). Twenty milliliters of octyl ether was mixed with 1.92 mL of oleylamine at room temperature for ~10 minutes, and subsequently heated to 100°C over 20 min, under an Ar flow. At 100°C, 0.4 mL of iron pentacarbonyl was injected, and the temperature was increased to reflux for 2 hours, before cooling to room temperature by removing the heating mantle. The product was precipitated by adding anhydrous ethanol, and separated by centrifugation (9000 rpm), followed by three washings with anhydrous ethanol. The Fe₃O₄@NH₂ NPs were obtained by mixing 10 mL of 1 mg/mL Fe₃O₄@OA in hexane with 50 μ L of AEAP3,

and sonicating for 90 min. The resultant suspension was left overnight, and then separated by magnet. The separated NPs were washed five times with 40 mL anhydrous ethanol. These NPs can then be dispersed in water or PBS buffer.

4.3.1.3 Synthesis of Fe₃O₄@SiO₂ and Fe₃O₄@SiO₂@NH₂ NPs

Fe₃O₄@SiO₂ NPs were formed in a water-in-oil microemulsion: 0.5 mL of 1 mg/mL Fe₃O₄@OA nanoparticles in cyclohexane were injected into a mixture of 1.77 g of Triton X-100, 1.6 mL of anhydrous 1-hexanol and 7 mL of cyclohexane, and left under a strong vortex for 1 h, before adding 0.5 mL of 6% ammonia solution. After 1 h, 25 μ L of TEOS was added and left for 24 h. The product, core/shell Fe₃O₄@SiO₂, was separated by centrifugation at 9000 rpm, and washed with ethanol; the centrifugation/wash procedure was repeated at least three times. The resultant NPs were directly dispersed in deionized water or PBS buffer for use. For the formation of Fe₃O₄@SiO₂@NH₂ NPs, 25 μ L of AEAP3 was added into the reaction mixture for another 24 h. The product was separated, purified, and stored as were the Fe₃O₄@SiO₂ NPs.

4.3.1.4 NP characterization

The surface chemistry was characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), in a VG ESCALab 3 Mk II, using non-monochromated Al Ka radiation (1486.6 eV), at a power setting of 300 W, giving an instrument resolution of 0.85 eV. Magnetic properties were evaluated with a Quantum Design PPMS model 6000 magnetometer. Transmission electron microscopic (TEM) images were taken with a JEOL JSM-7600TFE, at a 200 keV accelerating voltage. The TEM specimens were prepared by dropping the NP suspensions (Fe₃O₄@OA in hexane, and the others in DI water) onto carbon-coated copper TEM grids, followed by evaporation under vacuum overnight.

4.3.1.5 NP preparation for cytotoxicological testing

Since it is intended that magnetic NPs accumulate at the target site, during drug delivery, at a locally elevated concentration, it is necessary to evaluate their cytotoxicity at such elevated concentrations. To do this, NPs were suspended in Ham's F-12K culture medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum). In establishing the concentrations to be used in our tests, we considered those of Fe₃O₄ used regularly in the literature for in vivo cytotoxicity assay. In order to obtain an idea of the toxicity of a CH₃ NP surface, which is

chemically nonreactive under present conditions, we tested $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$, the only NP not intended for ultimate medical use, at concentrations ranging from 0.15 to 0.90 mg/mL. In order for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ to be detectable by MRI, and given that the human dose concentration recommended for lymphography is $< 45 \text{ } \mu\text{mol/kg}$ (Woo et al., 2004), these latter three were additionally tested at concentrations from 0.05 to 200 $\mu\text{g/mL}$.

All the assays used controls. The background control was carried out with the medium only. The control cells were those incubated with medium plus supplements, but without NPs. The control particles were in wells without cells, which underwent the viability assay.

4.3.1.6 Cell culture.

The epithelium is the first barrier that confronts particles that deposit in the conducting airways or the alveolar region. Therefore, both bronchial and alveolar epithelial cells should be considered as target cells for in vitro studies (Moret, 2002). The human alveolar epithelial cell line A549 (CCL- 185) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC); A549 is a human Caucasian lung carcinoma type II epithelial cell. It was grown in a 75 cm^3 glass flask using Ham's F-12K, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin, to avoid bacterial contamination, and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95 % air. Cells were grown to 70%– 80% confluence and then trypsinized to dissociate adherent cells from each other and from the container.

4.3.2 Cytotoxicity tests

Currently used in vitro cytotoxicity assays measure cell viability via colorimetric methods. These methods can be further classified into tests that measure plasma membrane integrity and mitochondrial activity. Exposure to certain cytotoxic agents can compromise the cell membrane, which allows cellular contents to leak out. Viability tests based on this include that for LDH. In this assay, LDH, released from damaged cells, oxidizes lactate to pyruvate. The amount of LDH released is proportional to the number of cells damaged or lysed.

Mitochondrial activity is another colorimetric cytotoxicity assay, which attempts to determine the mechanism behind the induced cell death. Mitochondrial activity can be tested by using tetrazolium salts, as mitochondrial dehydrogenase enzymes cleave the tetrazolium ring.

Inflammation is also a possible adverse effect of NP exposure. Commonly tested proinflammatory cytokines, or protein signals, of inflammatory response include IL-1, IL-6, and TNF- α , among others. These cytokines are detected by using ELISA, and can be quantified by measuring the absorbance from either alkaline phosphatase or streptavidin-horseradish peroxidase-labeled antibodies.

The MTT, LDH, and ELISA tests, described above, were performed with the same concentration of cells. According to our methodology, after incubation of the cells with the nanoparticles, the supernatant was removed for LDH and ELISA tests, and the cells in the wells were used for the MTT test.

4.3.2.1 Assessment of cellular morphology by optical microscopy

The assessment of cellular morphology was carried out for Fe₃O₄@OA, which has a chemically nonreactive (Goffin et al., 2010) CH₃ surface (alkyl groups, such as CH₃ do not react chemically under the conditions of our experiment); this was done to determine whether a larger cell morphology study was necessary, considering factors other than the chemical groups present. To assess the cellular morphology, cells, treated with 0.47 mg/mL of Fe₃O₄@OA in Ham's F-12k culture medium, were incubated for 24 and 72h at 37 °C. Optical photomicrographs of the cells were taken at an enlargement of 20X, and the morphology of attached A549 cells was qualitatively evaluated.

4.3.2.2 Determination of mitochondrial activity, using the MTT test

The MTT assay is based on the reduction of MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) by mitochondrial succinate dehydrogenase, to form dark blue formazan crystals. Only viable cells, with active mitochondria, reduce significant amounts of MTT to formazan (Oberdorster et al., 2005). For this assay, cells were seeded in a 96-well plate, using 1×10^4 cells/well, and incubated for 24 h, before adding various concentrations of Fe₃O₄@NH₂, Fe₃O₄@SiO₂ and Fe₃O₄@SiO₂@NH₂ NPs to each well, and incubating the cells for a further 24, 48, and 72 h. After the incubation period, 20 μ L of MTT (0.5 mg/mL in phosphate buffer, at pH 7.4) was added to each well and the cells were incubated for another 3 h. After discarding the media, the formazan crystals were solubilized by 100 μ L of dimethyl sulfoxide

(DMSO) per well and the absorbance was measured at 570 nm using a BioTek Synergy 2 microplate reader.

4.3.2.3 Determination of lactate dehydrogenase

LDH leakage due to membrane damage was assessed by measuring the quantity in the media after the incubation of cells and the NPs to be analyzed (Beasley, Auffarth, & von Recum, 1996). Using 2×10^4 cells per well in a 96-well plate, incubation occurred for a period of 24 h, with NPs at concentrations from 0.05 to 100 $\mu\text{g/mL}$. The release of LDH into the supernatant was determined by an LDH activity assay kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Incubation with 1% Triton-X100 served as a positive control, and cells without NPs, as a negative control. The results are given relative to the positive control, in percent:

$$((S-C) / (T-C)) \times 100;$$

Where S = sample value, C = negative control value, and T=1% triton positive control value.

4.3.2.4 Quantification of cytokines by ELISA

Studies have shown that the A549 human lung epithelial cell line can synthesize relevant cytokines, including IL-6, which appear to play a role in the initiation of inflammation and, possibly, to contribute to the polarization of a Th2-dominated immune response, which plays a role in the development of allergic respiratory diseases (Hulander et al., 2009). Concentrations of IL-6 in the supernatants obtained after exposure of NP suspensions were determined by sandwich ELISA with appropriate antibodies, according to the manufacturer's instruction (R&D Systems, Minneapolis, USA).

4.4 Results

4.4.1 Nanoparticle characterization

The TEM image of as-synthesized $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$ NPs, shown in Figure 4-1(a), indicates a narrow size distribution, with an average diameter of ~ 15 nm. Figure 4-1(b) shows the

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ NPs; one finds that the self-assembled $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$ NPs in Figure 4-1(a) have been replaced by disordered array, ascribed to the change of surface functional groups. Images of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ are shown in Figure 4-1(c,d), respectively. From the statistical analysis of 200 particles, the particle diameters are ~ 56 and ~ 65 nm, respectively, indicating shell thicknesses of ~ 20 and ~ 30 nm. Compared with the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles, the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ NPs present a mesoporous silica shell with open pores extending to the surface. These mesoporous shells, containing both primary and secondary amine groups, may be used for medical applications, as carriers of biological species, such as drugs, antibodies and proteins. Compared with $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ NPs, we find that the silica coatings result in better dispersibility and stability in aqueous solution, as shown in Figure 4-2. This may be because of hydrogen bonding with the solvent. Considering the different surface functional groups and microstructures, we were curious as to whether these features affect their cytotoxicity.

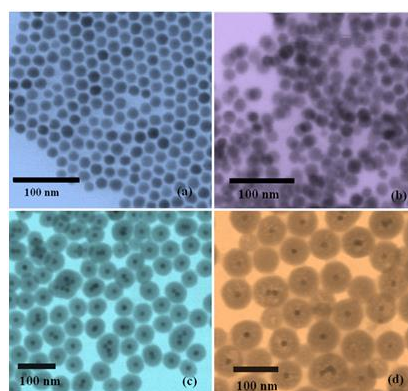


Figure 4-1: TEM images of (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$, (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, and (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ NPs



Figure 4-2: Optical photographs of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$ NPs, which can be easily dispersed in hexane (left); after silica coating, the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ NPs can be dispersed in aqueous solution (right).

The XPS survey spectra for the nanoparticles are seen in Figure 4-3, and the relative concentrations of the elements found in Tables 4-I and 4-II. As Table 4-I indicates, the shells are sufficiently thick to obviate the detection of Fe.

Table 4-I : Elemental composition on NPs surface

TABLE I. Elemental Composition on NPs Surface

	Carbon (%)	Oxygen (%)	Nitrogen (%)	Silicium (%)
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$	88.80	10.17	–	0.42
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$	87.54	8.14	2.48	1.38
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	45.35	40.19	–	14.46
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$	54.24	28.36	8.20	9.20

Because the attenuation length of the $\text{Fe}2p$ electron is ~ 1.3 nm, the probe depth (three times the attenuation length) is ~ 4 nm; this means that all the shells are at least 4 nm thick. The presence of trace Si in the case of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$ is probably because of contamination.

Table 4-II: Elemental composition on NPs surface before and after suspension in the Ham's F-12K

TABLE II. Elemental Composition of NPs Surface Before and After Suspension in the Ham's F-12K

E	AS	CM	C
Fe₃O₄@NH₂			
Silicium	2.63	0	0
Carbon	48.8	63.18	59.55
Nitrogen	7.75	10.27	12.47
Oxygen	36.1	23.08	23.55
Fe₃O₄@SiO₂			
Silicium	19.51	0	0
Carbon	26.14	65.98	58.72
Nitrogen	0.71	6.36	11.93
Oxygen	52.21	14.44	25.55
Fe₃O₄@SiO₂@NH₂			
Silicium	20.73	0	0
Carbon	22.45	61.14	57.85
Nitrogen	5.34	11.29	11.95
Oxygen	51.48	23.32	25.53

E, elements; AS, NPs after synthesis; CM, NPs after suspension in the culture media; C, NPs suspended in the culture media and after contact with cells.

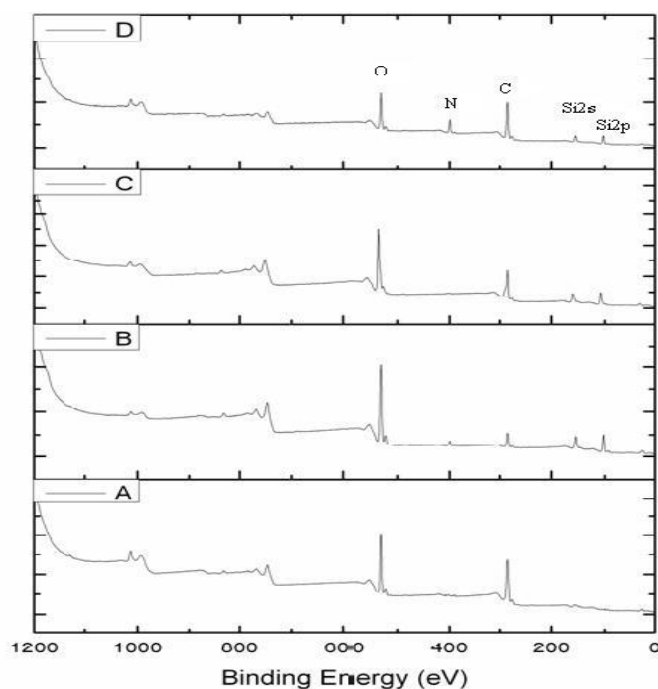


Figure 4-3: XPS survey spectra of (a) Fe₃O₄@OA, (b) Fe₃O₄@NH₂, (c) Fe₃O₄@SiO₂ and (d) Fe₃O₄@SiO₂@NH₂ NPs

The relative elemental concentrations of NPs as synthesized, on contact with the culture medium at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ and on cell contact, are found in Table 4-II, and are given as histograms in Figure 4-4. Table 4-II and Figure 4-4 show that, on contact with both culture medium and cells, the NPs undergo changes in carbon, nitrogen, and oxygen concentrations, indicating surface modification.

On exposure to culture medium, this probably occurs through corona formation by one or more of the medium components. For the @NH₂-terminated shells, the elemental concentrations do not appear to change after subsequent cell contact; however, for @SiO₂-terminated shell, there is a clear enrichment in both O and N, indicating corona modification.

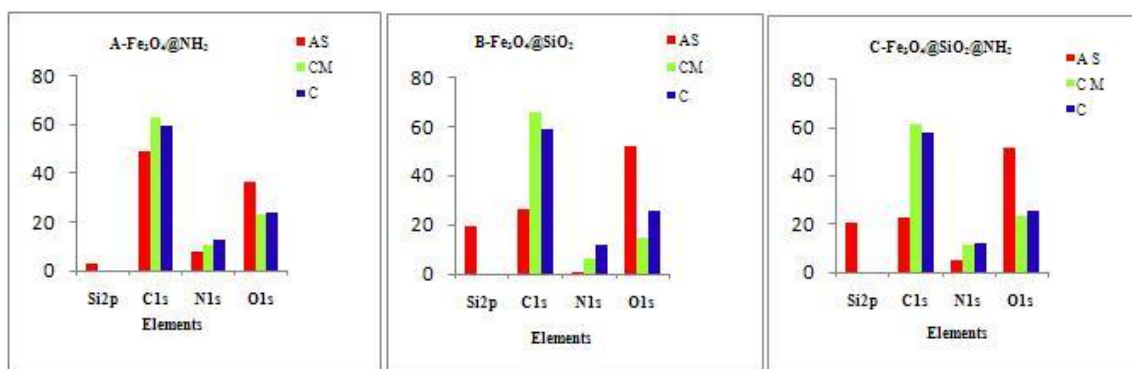


Figure 4-4 : Elemental composition of NP surfaces before and after suspension in the Ham's F-12K, as determined by XPS. E, elements; AS, as synthesized; CM, after suspension in the culture media; C, after contact with cells

4.4.2 Viability of cells after incubation with nanoparticles

4.4.2.1 Assessment of cellular morphology on exposure to Fe₃O₄@OA

The capacity of the A 549 cell line to maintain morphology, on 24 and 72 h incubation with functionalized SPIONs, was determined by optical microscopy, using Fe₃O₄@OA, and the results are found in Figure 4-5. The photomicrographs show that the cell morphology was altered, compared with the controls. Growing the cells with SPIONs produced a significant difference of the lateral extension of the cells, compared to that of the control cell population [Figure 4-5(a–d)]. After 72 h, the morphology of the cells did not improve with time; the A 549 cells shrank and became irregular in shape [Figure 4-5(d)]. This effect of Fe₃O₄@OA on cell morphology is

surprising, and certainly not because of chemical reaction with the NP surface CH₃ groups.

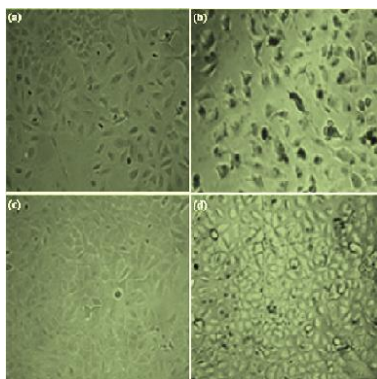


Figure 4-5: Morphological differences of the A549 cells before and after exposure to Fe₃O₄@OA. (a) Control: no treatment during 24 h, (b) exposure for 24 h, (c) control: no treatment for 72 h, (d) exposure for 72 h.

4.4.2.2 Assessment of cell proliferation after 72 h of exposure to Fe₃O₄@OA.

Figure 4-6(a) shows a photomicrograph of the A 549 cells cultured without particles (control). As seen, the cells are confluent. Figure 4-6(b–d) present photomicrographs of A 549 cells cultured with Fe₃O₄@OA. After 72 h, the cells show a significant dose-dependent reduction in their growth capacity. The photomicrographs reveal that, with increasing concentration, from 0.15 to 0.90 mg/mL, cells become rounded and lose cell-to-cell and cell-to-dish contact. These concentrations also lead to a detectable decrease in proliferation and to a cell morphology alteration.

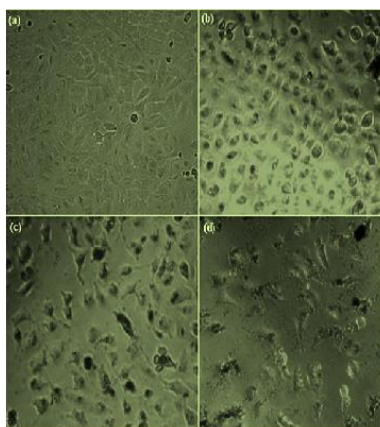


Figure 4-6: Reduction of cellular proliferation with increasing concentration of NPs: (a) Control, (b) 0.15, (c) 0.47, and (d) 0.90 mg/mL.

4.4.2.3 Determination of LDH leakage.

The rupture of the cell membrane induces the release of LDH into the extracellular medium, with the quantity of LDH that is salted out in the culture medium being proportional to cellular death. The percentage of LDH was calculated by dividing the quantity in the medium (sample tested) by the positive control (lysed cells). The negative control consisted of cells unexposed to NPs, in their culture medium. The results represent the average of three independent experiments. For the three types of NPs, we find that the quantity of LDH begins to increase, corresponding to lower viability, beginning between 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ for both $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ (Figure 4-7). Both have the same surface functionalities and amine concentrations after suspension in culture medium (see Table 4-II, column CM). However, as mentioned earlier, they differ in size (Figure 4-1). Given the size differences, we believe that the rate difference involves the difference in size, and are pursuing this in our present studies. This view is supported by previously published studies (Oh et al., 2010; Thorek & Tsourkas, 2008).

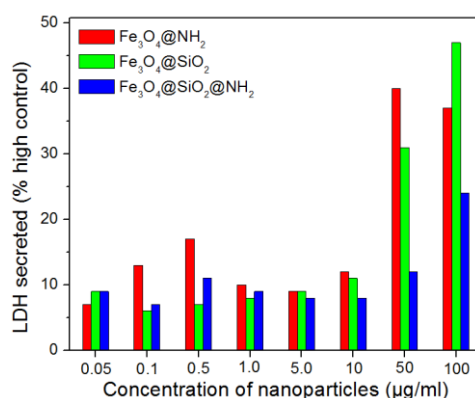


Figure 4-7: Effect of nanoparticles on the secretion of LDH by A549 cells.

4.4.2.4 Quantification of cytokines by ELISA.

Our aim was to see whether NPs, when exposed to the cells, induced the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6. The A549 cells were exposed to several concentrations of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ NPs, as with the LDH test. The quantitative evaluation of IL-6 was carried out as described in the Methods section. The control consists of cells in the culture medium without NPs. The results confirm those of the LDH test: large quantities of IL-6 are produced by cells exposed to high concentrations of all the functionalized

NPs. Cells show a significant difference from the control, at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 4-8), although lower concentrations (10 $\mu\text{g/mL}$ and less) do not show such a difference.

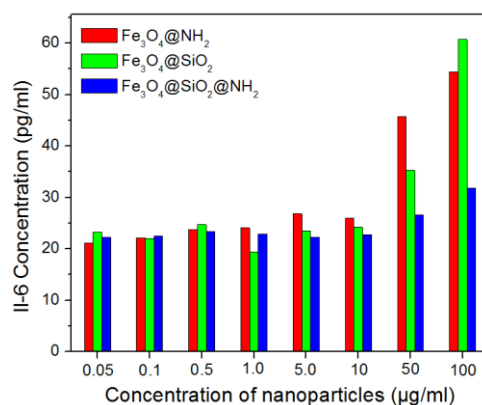


Figure 4-8: Quantity of IL-6 secreted by A549 cells exposed to NPs at various concentrations

4.4.2.5 Assessment of cell viability by MTT test.

The results of the MTT assays show that exposure to both $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ NPs caused similar reductions in cell viability as a function of time, compared with $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, which is different (Figure 4-9). However, all the NPs are seen to become more toxic with time, especially at low concentrations (Figure 4-10).

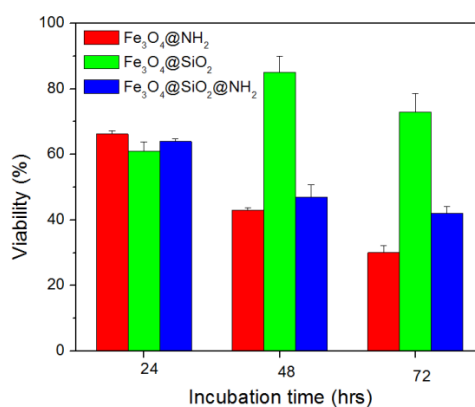


Figure 4-9 : Cellular viability as a function of duration, at a NP concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$.

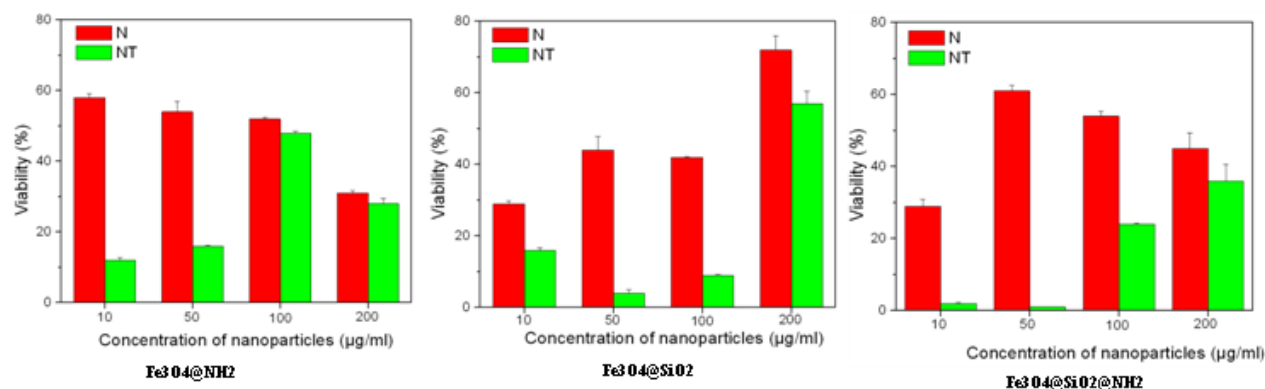


Figure 4-10 : Cellular viability after 72 h of exposure of NPs left in the culture medium for 2 (N) and 24 h (NT) before contact with the cells.

4.5 Discussion

As indicated in the Introduction, the biocompatibility of SPIONs is a prerequisite for any clinical use. Up to now, the overwhelming majority of reports have claimed that SPION are biosafe because they are presumably bio-inert and/or because their metabolite, Fe, is essential for living organisms and thus biocompatible. Many studies have also shown no adverse effects on potential cytotoxicity and cell function at low doses (10 pg Fe/cell) for optimal MRI cell tracking (Kroll, Pillukat, Hahn, & Schnekenburger, 2009). The conclusion of biosafety, however, may be premature, given the lack of criteria for evaluating the safety and toxicity of these nanomaterials. Indeed, growing evidence has demonstrated that SPION labeling more or less alters several cellular events of mesenchymal stem cells (Bulte, 2009). Therefore, the effects of SPIONs on diverse aspects of cellular activities should be carefully evaluated even though such NPs are generally considered biocompatible at present.

4.5.1 Cell morphology

A change in cell morphology is one of the first signs of its exposure to toxic products (Kostura, Kraitchman, Mackay, Pittenger, & Bulte, 2004). After 24 and 72 h of Fe₃O₄@OA NP exposure, the cell morphology was found to be altered (Fig. 5), characterized by a reduction of the lateral extension of the cells. This indicates a reduced adhesion of the cells to the substrate [Fig. 5(b,d)], indicating a disturbance of the structure and function of the cytoskeleton, and suggesting that the

CH₃-functionalized NPs have caused deterioration in elements of the matrix (probably fibronectin and biopolymers, as was found for NH₂ functionalization (AshaRani, Low Kah Mun, Hande, & Valiyaveetil, 2009) that influence cellular proliferation.

Fe₃O₄@OA is found to be toxic for A549 cells. Similar results have been reported by Yin and his collaborators, who demonstrated that the Fe₃O₄@OA (CH₃-exposed) were more cytotoxic than Fe NPs with two layers of oleic acid (COOH-exposed) (Christopher, Judge, Vincent, Higgins, & McKeown-Longo, 1999). Their study indicated that oleic acid, per se, is not cytotoxic; however, when spatially aligned, on being coated onto the NPs, cytotoxicity was observed. Our viability results suggest that the cellular responses depend on several parameters, of which NP functionalization is only one. As a result of this finding, we have initiated a testing program to determine these parameters.

4.5.2 Effect of nanoparticle functionalization

Besides the NP size, the chemical nature of its surface appears to determine the intensity of the biological effects with significant differences between different types of coating because of their differing surface chemistries that react in different fashions with the components of the culture medium before reacting with the cells. That appears to explain why cells exposed to NPs with an amine coating (Fe₃O₄@NH₂ and Fe₃O₄@SiO₂@NH₂) react with the same tendency, compared to one with a silica coating (Fe₃O₄@-SiO₂) at a concentration of 200 µg/mL. We are presently exploring this with other functionalized nanoparticles, and will report our findings in a future paper.

4.5.3 Effect of corona

We can observe the initial effect of a coating when NPs are suspended in solution. Some coating reduces the interaction between NP themselves, which reduces aggregation, while other coatings facilitate dispersion. Figure 4-2 shows the @OA coating that does not mix with water, and the @SiO₂ coating, which is more dispersible. The state of agglomeration of Fe₃O₄@OA in water is a parameter that may be a bias in our cytotoxic analysis, as well as that of Yin et al. (Yin, Too, & Chow, 2005), discussed above. Fe₃O₄@NH₂ and Fe₃O₄@SiO₂@NH₂ NPs contain exposed amine groups, and Fe₃O₄@SiO₂ NPs contain exposed hydroxyl groups, both groups assuring good aqueous dispersibility. The TEM images in Figure 4-1(b–d) confirm this, and no particle stacking

is observed. Cell viability assays indicate that the presence of the NPs reduces cell viability significantly ($p < 0.05$), as compared to the cells that were not exposed. One possible explanation for this may be that these NPs are taken up by the cells as a result of endocytosis, promoting apoptosis (Gupta, A. K. & Gupta, 2005a).

Despite the fact that exposure to NPs reduces viability, we note that those with silica coatings are less toxic than those with amine group coating, as shown in Figure 4-9. NP interactions with cells depend on their surface chemical properties, which may be explained by their interactions with components of the cell medium and the resultant modification of the NP surface (Gupta, Ajay Kumar & Curtis, 2004). Thus, the NP coating has an important role to play in cellular functions, including cell growth, migration, differentiation, survival, and tissue organization.

Regarding safety assessments, it is increasingly evident that nanomaterials cannot be treated in the same manner as chemical compounds. Interactions between NPs and nutrient medium components occur, and must have an impact on any subsequent cyto- and genotoxicity test results.

The growth factors, amino acids, and nutrients necessary to support cell growth, contained in nutrient media, are demonstrably adsorbed onto the NP surfaces, forming coronas (Lynch & Dawson, 2008). The variations of relative elemental concentrations we determined by XPS (Table 4-II), on NP contact with the culture medium, indicates corona formation prior to cell contact. The influence of this interaction on cellular response varies with time, as illustrated in Figure 4-10. The results of such interaction remain to be identified by more specific analysis, a study necessary to determine the specific chemical groups that influence cell viability.

4.5.4 Effect of culture medium

During viability assay, the SPIONs are added to Ham's F-12K, which contains amino acids, inorganic salts, vitamins, etc., as described by the manufacturer (ATCC, A. T. C. C., 2004). There are interactions reported between chemical groups on the NPs and various components of the medium in which they are suspended (Allouni, Cimpan, Hol, Skodvin, & Gjerdet, 2009; Buford, Hamilton, & Holian, 2007); these interactions appear to influence the state of agglomeration of the NPs and the materials adsorbed on their surfaces. The effective unit of interest in the cell-nanoparticle interaction is, then, not the NP but the corona-covered NP. It is

the nature of the organization of the absorbed biomolecules on the NP surface, and any subsequent change in their epitopes, that determines the initial biological response to the presence of NPs. Because nutrient media differ, the interactions we identified must be specific to Ham's F-12K (Allouni et al., 2009); this is presently being explored.

In the present study, we examined the effect of a wide range of NP concentrations on A549 cells. LDH and IL-6 essays show that our NPs have low toxicity overall, becoming toxic to A549 cells at concentrations above 50 $\mu\text{g/mL}$.

The MTT assay shows that, at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, no difference is observed after 24 h exposure of the three types of NPs, but after 48 and 72, the amine-coated NPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$) show a decreasing viability while the silica-coated NPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) shows better viability. In addition, the MTT assay shows that all the NPs suspended in culture medium for 2 h before exposure to A-549 cells are less toxic than when they are suspended for 24 hours, suggesting a time-dependent surface chemical change at the NP surface.

As mentioned earlier, a good correlation already exists between the ELISA and LDH results (Figs. 7 and 8, both containing results for 100 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h). We note that the percentages of cell viability obtained with the MTT test showed a remarkably similar significant decrease in viability after 24 hours in contact with all three types of NPs, at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 4-9). We have every reason to believe that the trends indicated in Figures 4-7 and 4-8 will persist to a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$.

4.6 Conclusions

We have determined the cytotoxicities of several functionalized magnetite NPs, including $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$. All show cytotoxic effects at concentrations above 50 $\mu\text{g/mL}$. The first, and most readily noticeable, effect is the alteration of cell shape, but there are also mitochondrial dysfunction, an increase of LDH leakage, and IL-6 secretion. These cellular responses depend on several parameters, including:

1. Surface functionalization: the MTT assay reveals functionalization- dependent cytotoxicity of NPs towards epithelial cells.

2. Corona formation: XPS analysis has shown corona formation on the NP surface on suspension in culture media.

3. A dynamic interaction between NP and culture medium: the time of suspension has an impact on cell response.

Further studies are in progress to identify the specific bimolecular interaction with the functionalized surfaces and their effect on subsequent cell contact.

4.7 References

1. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2007;3:20–31.
2. Linazasoro G. Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy. *Parkinsonism and Relat Disord* 2008;14: 383–392.
3. Silva GA. Neuroscience nanotechnology: Progress, opportunities and challenges. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:65–74.
4. Turk V, Kaisera C, Schalle S. Invisible but tangible? Societal opportunities and risks of nanotechnologies. *J Cleaner Prod* 2008; 16:1006–1009.
5. Singha N, Jenkinsa GJS, Asadib R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev* 2010; 1:5358–6032.
6. Na HB, Song IC, Hyeon T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Adv Mater* 2009; 21:2133–2148.
7. Zabow G, Dodd S, Moreland J, Koretsky A. Micro-engineered local field control for high-sensitivity multispectral MRI. *Nature* 2008;2008:1058–1063.
8. Park MV, Annema W, Salvati A, Lesniak A, Elsaesser A, Barnes C, McKerr G, Howard CV, Lynch I, Dawson KA and others. In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;240: 108–116.
9. Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH. Nanotechnology, nanotoxicology and neuroscience. *Prog Neurobiol* 2009;87:133–170.

10. Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R, Pompa PP. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein_nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano* 2010;4:7481–7491.
11. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Bergga°rd T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. Understanding the Nanoparticle protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:2050–2055.
12. Unfried K, Albrecht C, Klotz L-O, Von Mikecz A, Grether-Beck S, Schins RPF. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 2007;1:52–71.
13. Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR. Nanomaterials in the environment: Behaviour, fate, bioavailability and effects. *Environ Toxicol Chem* 2008;27:1825–1851.
14. Zhang X, Clime L, Roberge H, Normandin F, Yahia L'H, Sacher E, Veres T. pH-triggered doxorubicin delivery based on hollow nanoporous silica nanoparticles with free-standing superparamagnetic Fe₃O₄ cores. *J Phys Chem* 2011;115:1436–1443.
15. Woo K, Hong J, Choi S, Lee HW, Ahn JP, Kim CS, Lee SW. Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Chem Mater* 2004;16:2814–2818.
16. Moret S. “Synthe`se et modification chimique de la surface des nanoparticules de maghemite a des fins d'applications biomédicales “, PH.D. dissertation, -France,. Bordeaux: Universite de Bordeaux I; 2002. 221 p.
17. Goffin AL, Duquesne E, Raquez JM, Miltner HE, Ke X, Alexandre M, Van Tendeloo G, Van Mele B, Dubois P. From polyester grafting onto POSS nanocage by ring-opening polymerization to high performance polyester/POSS nanocomposites. *J Mater Chem* 2010;20:9415–9422.
18. Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: Elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 2005; 2:8.
19. Beasley AM, Auffarth GU, Von Recum AF. Intraocular lens implants: A biocompatibility review. *J Invest Surg* 1996;9:399–413.

20. Hulander M, Hong J, Andersson M, Gerven F, Ohrlander M, Tengvall P, Elwing H. Blood interactions with noble metals: Coagulation and immune complement activation. *ACS Appl Mater Interf* 2009;1:1053–1062.
21. Thorek DLJ, Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials* 2008;29:3583–3590.
22. Oh WK, Kim S, Choi M, Kim C, Jeong SY, Cho BR, Hahn JS, Jang J. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano* 2010;4:5301–5313.
23. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72:370–377.
24. Bulte JWM. In vivo MRI cell tracking: Clinical studies. *Am J Roentgenol* 2009;193:314–325.
25. Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed* 2004;17:513–517.
26. Asharani PV, Mun GLK HM, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009;3: 279–290.
27. Christopher RA, Judge SR, Vincent PA, Higgins PJ, McKeown-Lon PJ. The amino-terminal matrix assembly domain of fibronectin stabilizes cell shape and prevents cell cycle progression. *J Cell Sci* 1999;112:3225–3235.
28. Yin H, Too HP, Chow GM. The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. *Biomaterials* 2005;26: 5818–5826.
29. Gupta A.K, Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 2004;26:1565–1573.
30. Gupta AK, Curtis ASG. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials* 2004;25:3029–3040.
31. Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions. *Nano- Today* 2008;3:40–47.

32. ATCC. F-12K Medium Formulation. In: Collection ATC, editor. <http://www.atcc.org/Attachments/4892.pdf>. Manassas USA; 2004.
33. Buford MC, Hamilton RF Jr, Holian A. A comparison of dispersing media for various engineered carbon Nanoparticles. Part Fibre Toxicol 2007;4:6.
34. Allouni ZE, Cimpan MR, Hol PJ, Skodvin T, Gjerdet NR. Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium Colloids Surf B Biointerfaces 2009;68:83–87.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : PROTEIN CORONA FORMATION ON MAGNETITE NANOPARTICLES: EFFECTS OF CULTURE MEDIUM COMPOSITION, AND ITS CONSEQUENCES ON SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLE CYTOTOXICITY

D. A. Mbeh¹, T. Javanbakht¹, L. Tabet², Y. Merhi³, K. Maghni², E. Sacher^{1,4}, L'H. Yahia¹.

¹Laboratory for Innovation and Analysis of Bio-Performance, École Polytechnique, C.P. 6079, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3A7 Canada

²Research Center, Hôpital Sacré-Cœur Montreal, 5400 Boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, H4J 1C5 Canada

³Montréal Heart Institute, Université de Montréal, 5000 rue Belanger, Montréal, Québec, H1T 1C8 Canada

⁴Regroupement Québécois de Matériaux de Pointe, École Polytechnique, C.P. 6079, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3A7 Canada

Published by Journal of Biomedical Nanotechnology, 01/2014; Vol. 10:1-13. DOI: 10.1166/jbn.2014.2000

5.1 Abstract

The physicochemical properties and potential cytotoxicity of nanoparticles (NPs) are significantly influenced by their interaction with proteins, which results in corona formation. Here, we have determined whether corona formation, resulting from interactions between superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and different cell culture media, may have consequences for driving NP toxic effects. To address this issue, complementary methods were used. The determination of the hydrodynamic size distribution by ζ (zeta) potential measurement indicated that SPIONs were negatively charged under all conditions but that the actual charge

was differed with the cell culture medium used. *In vitro* protein adsorption studies were carried out using the Bradford protein assay and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The Bradford assay revealed that the concentration of unadsorbed proteins and other biomolecules decreased when the SPION concentration increased. FTIR showed that the proteins were, indeed, adsorbed onto the NP surface. This was followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight secondary ion mass spectrometry (MALDI TOF-SIMS), to identify the adsorbed proteins. Ultimately, three different cell viability assays led to the conclusion that the SPIONs were not toxic for all the concentrations used here. In summary, we found that corona formation on the SPIONs depends on the composition of the culture media but has no consequence for nanotoxicity. We have shown that the application of complementary methods has provided novel insights into SPION/protein interactions.

5.2 Introduction

In recent years, the application of nanoparticles (NPs) to nanomedicine, particularly as prodrugs, has led to a surge in the number of papers devoted to the chemical characterization of their surfaces and how their chemistry influences interactions with biological fluids. Since bodily fluids, such as blood, may contain several thousand proteins, the formation and characterization of the protein corona that forms around the NPs have received much attention. An abundance of papers in this particular area has led to attempts, welcomed by workers in the field, to critically review their findings. A partial list of recent reviews of nanoparticle-corona interactions (also couched as feature articles, perspectives, opinions, etc.) is found in references (Auffan, Bottero, Chaneac, & Rose, 2010; Casals & Puentes, 2012; Lynch et al., 2007). Despite the fact that these are serious reviews, they give, at times, opposing views while referring to the same studies; as Pelaz *et al.* note, “Although trends for protein-NP interactions have emerged, counter-examples are not rare” (Pelaz et al., 2013).

Further, as Walkey and Chan (Walkey & Chan, 2012) note, “Despite a great deal of empirical evidence, a clear relationship between the synthetic identity of a nanomaterial, and the structure and composition of the protein corona has not yet emerged.” This may well be due to two factors: first, in the vast majority of cases, we have little knowledge of the chemistry of the NP surface, although it appears that, with what we do know, batch-to-batch surface chemical reproducibility may not be possible (Franca, Zhang, Veres, Yahia, & Sacher, 2013b).

Second, we have no idea, except in rare cases (Natte et al., 2013), what the NP corona looks like. Google Images, queried on May 29, 2013, using the phrases, “protein dimensions” and “nanoparticle protein corona”, returned hundreds of cartoon models of what the protein conformation that is adopted on the NP is thought to look like, with the exception of the single HRTEM photomicrograph cited above (Natte et al., 2013). Indeed, since protein dimensions may vary over several orders of magnitude (Maiorov & Crippen, 1992; Vogler, 2012), ranging from substantially smaller than our NPs to substantially larger, and we know neither the protein conformation adopted in the corona nor the extent of NP coverage, we may have no idea which of the two is the dog and which, its tail.

The corona presents biological properties that depend on protein adsorption affinity and conformation, and the exposure of novel epitopes (Cedervall, Lynch, Lindman, et al., 2007; Jiang et al., 2010). Consequently, the encounter between a NP and a cell is governed by the properties of the protein corona rather than those of the original NP surface (Stark, 2011). More specifically, the identification of the adsorbed proteins and the evaluation of their lifetimes on NP surfaces (as governed by kinetic rates vs. thermodynamic stability) are very important, as they shape protein-NP interactions (Lynch et al., 2009; Walczyk, Bombelli, Monopoli, Lynch, & Dawson, 2010). Therefore, better understandings of the NP-protein complex and of the structural and dynamic properties of the protein corona, at the molecular level, are essential to the development of functionalized NPs that are medically safe. However, the challenge in assaying toxicology is that many NPs have been found to interfere with currently used *in vitro* assays (Kroll, Pillukat, Hahn, & Schneckeburger, 2012; Monteiro-Riviere, Inman, & Zhang, 2009), so it is necessary to validate, or to amend, these existing assays to overcome this problem. Moreover, a standardized assessment is necessary so that results from different laboratories, which may use slightly different techniques or culture media, can be compared.

In this article, we use a batch of Fe_3O_4 NPs, also known as superparamagnetic iron oxide NPs (SPIONs), which previously underwent exhaustive surface characterizations, both at the chemical and morphological levels (Poulin, Franca, Moreau-Belanger, & Sacher, 2010). We know their surface chemical structure and the contaminants present there. What we want to know are whether and how they bond to the proteins present in a well characterized serum (fetal bovine serum, often used in cell media), how the cell medium, itself, affects these processes, and their consequences for driving potential toxic effects of these SPIONs. In this study, we have

examined whether the influence of corona formation on cell viability occurs in the short or long term, and whether the types of adsorbed protein and their relative quantities have consequences for driving SPION toxic effects. Because the identification of weakly bound (“soft” corona) proteins is beyond our present capacity, we limit ourselves to the identification of the strongly bound (“hard” corona) proteins.

5.3 Materials and methods

The magnetite (Fe_3O_4), > 99% pure, was purchased from Alfa Aesar (#44120) and used without further purification; it is the same batch previously characterized by us (Poulin et al., 2010). Cell culture media (DMEM, DMEM/F12 and Ham’s F12-K) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA), and their complete formulations are available online. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) kit was obtained from Trevigen, the PrestoBlue Cell Viability Reagent was obtained from Invitrogen, the fetal bovine serum (FBS) and Trypan Blue from Gibco Invitrogen, and the Serum-Free Media Supplement (SFMS) from Peprotech, Inc.

5.3.1 Particle Preparation

Corona formation was carried out by transferring the SPIONs into one of the cell culture media (DMEM, DMEM/F12 or Ham’s F12-K), containing 1% (v/v) penicillin/streptomycin antibiotics, without serum or with either 10% FBS or 1.5% SFMS. Each suspension was sonicated for 30 s, (Misonix Sonicator S-4000), to disperse the particles, and was then mixed on a rotating wheel for 1 h. Taking into consideration the magnetite concentrations most used in the literature (Ge et al., 2009; Hussain, Hess, Gearhart, Geiss, & Schlager, 2005), and the fact that the human dose recommended for lymphography is < 45 $\mu\text{mol/kg}$ (Dousset et al., 1999), each stock solution was serially diluted to yield three concentrations: 10, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ (6.1, 30.3 and 60.6 $\mu\text{g/cm}^3$) (Wottrich, Diabate, & Krug, 2004). Serum-free SPION suspensions were prepared at these concentrations, in both pure water and cell culture media for comparison purposes, by adding the SPIONs to the medium of interest. While all suspensions were characterized, only those in culture media containing FBS and SFMS were used for the cellular viability tests.

5.3.2 Particle characterization

5.3.2.1 Dynamic Light Scattering and Zeta (ζ) Potential Measurements.

The SPIONs samples were analyzed at a temperature of 25° C. Control measurements were carried out using culture media and serum solutions in the absence of nanoparticles. The instrument employed was a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), using a 633 nm laser.

Particle hydrodynamic size was obtained by measuring the time-dependent fluctuations of dynamic light scattering arising from the SPION suspension undergoing random Brownian motion: the diffusion coefficient of the particles is deduced and analyzed to give the mean hydrodynamic diameter.

For the ζ potential measurement, the instrument uses laser Doppler electrophoresis to measure the net velocity of the SPIONs in the liquid under an applied electric field. The results are given as mean values of three different samples.

5.3.2.2 High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM)

We chose to see how the protein corona conformed to the shape of the SPION, by comparing photomicrographs before and after corona formation, and how the culture medium influenced the conformation. HRTEM samples were prepared by incubating the SPIONs in culture media supplemented with serum at 37 °C for 1 h. The samples were then centrifuged to a pellet containing the protein–SPION complex. The pellet was washed with water, to remove unbound and loosely bound (soft) protein components. After re-suspension in water, a drop of the suspension was placed onto a carbon-coated nickel grid (300 mesh), followed by evaporation. HRTEM images were recorded with a JEOL 2000FX electron microscope.

5.3.2.3 In vitro protein binding assays

There are several methods currently used to analyze the corona qualitatively and quantitatively. We have chosen to concentrate on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight secondary ion mass spectrometry (MALDI TOF-SIMS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the Bradford protein assay because they are very sensitive and reliable, and because complex mixtures can be separated accurately, using only a few micrograms of sample. With

MALDI TOF-SIMS and FTIR, proteins adsorbed onto the SPION surface are identified, while the Bradford protein assay quantifies the proteins that were not adsorbed.

5.3.2.3.1 Protein adsorption studies using the Bradford protein assay

Three concentrations of SPIONs (10, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) were added to the various culture media, supplemented with 10% FBS or 1.5% SFMS. The suspensions were run through a strong magnetic field, using magnetic-activated cell sorting (MACS) to trap the SPIONs in the magnetic column, collecting the flow-through fraction. These fractions, containing the proteins that did not adsorb on the NP, were analyzed according to Bradford (Karatas et al., 2009; Simon-Deckers et al., 2008) using bovine serum albumin (BSA) as the standard. All the measurements were done in triplicate, and the average values are presented. This method is regularly employed to study protein adsorption in biomaterials (Karatas et al., 2009).

5.3.2.3.2 Protein adsorption studies using FTIR

We initially used centrifugation to isolate the SPIONs suspended in the different culture media. This method may be used to analyze hard and soft coronas. However, because the pellet formed at the bottom of the tube could also entrain a small quantity of medium, which would serve to distort the results, we ultimately chose a second method, where suspensions were run through a strong magnetic field, using MACS to trap the SPIONs, while collecting the flow-through fraction for the Bradford assay. While this latter method avoids the trapped solution problem, the washing step removes the soft corona, permitting the observation of only the hard corona. A Thermo Scientific model Nicolet 6700 FTIR spectrometer, with a SMART iTR attenuated total reflectance probe, was used to record spectra, in the range $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, at 4 cm^{-1} resolution; 64 scans were co-added to improve S/N.

5.3.2.3.3 Protein adsorption studies using MALDI TOF-SIMS

MALDI TOF-SIMS is a soft ionization technique, which involves the initial generation of gas-phase analytes from the solid. It is the technique of choice for protein corona studies, as it provides qualitative and quantitative information regarding the protein mixture, and ensures high resolution and reduced cost (Rezwan et al., 2004). The principles of this method have previously been described (Barbucci et al., 2005; Mahmoudi, Lynch, et al., 2011). Briefly, subsequent to protein corona formation from culture media supplemented with 10% (v/v) FBS (1 h at room

temperature), the SPIONs in 1 ml of each sample were attracted to the bottom of the sample vial by an external magnet, and the supernatant was removed. Each sample was washed three times with 1 ml of water and, each time, a magnet was used to isolate the SPIONs from the solution. Ten μl of the collected SPIONs were diluted with 15 μl of 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich). Half a μl of the dispersion was deposited onto a stainless steel target and 0.5 μl of the matrix solution (a saturated solution of sinapinic acid (Fluka) in 1:1 acetonitrile (Fisher Scientific) : 0.1% TFA) was applied onto the SPIONs, and dried before analysis. The instrument used was a Bruker Reflex IV MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker-Franzen Analytik, Germany). It uses a pulsed N_2 UV laser (337 nm, 3 ns pulse width) for protein ionization and delayed extraction, combined with time-of-flight analysis for mass separation. Linear detection was employed, with a post-acceleration of 10 keV for improved sensitivity. For our experiments, the laser power was adjusted to approximately 80% of its maximum, for greatest ion yields, and the spectra presented are the sum of 1,000 pulses. External calibration was performed on a bovine serum albumin standard, with three point calibration, using the $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[2\text{M} + \text{H}]^+$ and $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ ions. All experiments were performed in triplicate.

5.3.3 Cytotoxicity Assays

5.3.3.1 Cell culture

The A549 cell line was purchased from ATCC. This cell line has been shown to grow in the three culture media used in the present study (Griesser et al., 2004; Kingshott, St John, Chatelier, & Griesser, 2000). Cells were cultured in DMEM, supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin. Cells were maintained at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. When cell monolayer confluency was reached, cells were enzymatically detached (0.1% trypsin-EDTA) and transferred to a fresh culture flask or 96-wells plate for assessing cell viability.

5.3.3.2 Cellular viability assays

The effects of SPIONs on the viability of A549 cells were determined with three different assays. The PrestoBlue assay measures cells metabolic activity through the reduction of the non-fluorescent resazurin molecule to a fluorescent metabolite. This assay is a relevant indicator to quantify cell viability. A549 cells were seeded into 96-well plates at a density of $5 \times 10^3/100 \mu\text{l}$

per well for 24 h. Cells were then incubated in the presence or absence of different concentrations of SPIONs for 24 h. Cell viability was measured according to the manufacturer's instructions. Briefly, 10 µl of the PrestoBlue solution were added to wells for 30 min of incubation. Then, 100 µl of supernatant from each well were transferred to a black plate, after which fluorescence, at 560 nm excitation was measured at 590 nm emission. Similar experiments were performed but with no cells (cell-free system) for the determination of potential interferences with the PrestoBlue assay.

The MTT assay used followed the method of Mosmann *et al.* (Mosmann, 1983), with some modifications applied by the manufacturer (Trevigen, Inc.). Briefly, cells were seeded on a 96-well plate, at a concentration of 1×10^4 /100 µl per well for 24 h, then cells were incubated with SPIONs as described above. After 24 h, 10 µl of MTT reagent were added to cell cultured wells, and plates were placed in an incubator for 4 hours. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells reduced the yellowish, water-soluble MTT to water-insoluble purple formazan crystals. When the purple precipitate was clearly visible under the microscope, 100 µl of detergent reagent were added for formazan solubilization. After 2 hours, the optical density was read at 570 nm, with 655 nm as the reference wavelength, using a Bio-Rad microplate reader. Cell-free system experiments were performed for the determination of potential interferences with the MTT assay

A third cell viability assay was added, which consists of measuring the exclusion of Trypan Blue dye by viable cells, and its incorporation in dead cells. Cells were seeded, at 1×10^5 cells/500 µl per well, in a 12-well plate, for 24 h. These cells were incubated with SPIONs (100 µg/ml) for 24 h, then enzymatically detached by trypsinization; 100 µl of the suspension were collected for the Trypan Blue exclusion, transferred to Eppendorf tubes and mixed with 20 µl of 1X Trypan Blue dye. Cell numbers were determined and the percentage of viable cells was calculated as:

$$\text{Viable cells (\%)} = [(\text{Number (No) of viable cells}) / (\text{No. of viable cells} + \text{No. of dead cells})] \times 100$$

5.4 Results

5.4.1 Particle Characterization

5.4.1.1 Protein adsorption from culture media

5.4.1.1.1 HRTEM

In Figure 5-1a, the protein layers appear as grey shadows around the dark particles. This clearly indicates that, as with the photomicrograph realized by Natte et al., the protein conforms to the shape of the SPION. Thus, new epitopes must be exposed, rendering it essential to determine corona toxicity.

5.4.1.1.2 Protein adsorption using the Bradford assay

As shown in Figure 5-1b, on addition of SPIONs to all the culture medium, there is a slight decrease in absorbance in the presence of both FBS and SFMS, even at the lowest concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$. These results indicate decreases of concentrations of protein (in the presence of FBS) and amino acid (in the presence of SFMS) in solution. However, the decrease is more visible in DMEM/F12, supplemented with FBS, than in any other media, suggesting that DMEM/F12 promotes a more abundant adsorption of proteins onto the SPIONs. Furthermore, the concentrations of unadsorbed proteins and amino acids decreased with increasing iron oxide concentrations.

5.4.1.1.3 FTIR analysis of protein adsorption on SPIONs

The adsorption of proteins on the surfaces of SPIONs, immersed in DMEM/F12 cell culture medium containing 10% FBS, was observed by FTIR (Figure 5-1c). The peaks at 1650 and 1540 cm^{-1} correspond to the amide I and amide II vibrations, respectively. The same peaks (not shown) were also observed for the samples of SPIONs immersed in F12K and DMEM culture media containing 10% FBS, but were absent in all other cases. Their intensity ratios, where observed, were the same for all the samples.

5.4.1.1.4 MALDI TOF-SIMS analysis of protein adsorption

MALDI TOF-SIMS has proven to be a very useful technique in detecting proteins adsorbed to surfaces (Barbucci et al., 2005; Mahmoudi, Lynch, et al., 2011), particularly from complex protein solutions, such as FBS. In addition to its sensitivity and rapid screening, this technique permits analyses of a wide variety of proteins and peptides (Wang, K. Y. et al., 2008). Further, compared to other corona analysis techniques found in the literature, such as one- or two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, it also permits us to analyze the corona without having to remove it from the SPION, avoiding any unintended denaturation and fragmentation that may occur during protein desorption.

Figure 5-2 presents MALDI TOF-SIMS spectra, after 1 h exposure to 10% FBS in DMEM, DMEM/F12 and F-12K culture media, following washing. They show the spectra, ranging from 0 to 75 kDa, of material desorbed from the SPIONs at concentrations of 50 (Figure 5-2-i) and 100 (Figure 5-2-ii) $\mu\text{g/ml}$. These spectra demonstrate, first, that the SPIONs eject low molecular weight material (1-11 kDa) from DMEM and DMEM/F12 while, for F-12 K, additional material is ejected, up to about 69 kDa for the 50 $\mu\text{g/ml}$ concentration. Since the material at 1 kD and below is also ejected from bare SPIONs, it clearly represents the adsorbed hydrocarbon layer found in the original characterization (Poulin et al., 2010).

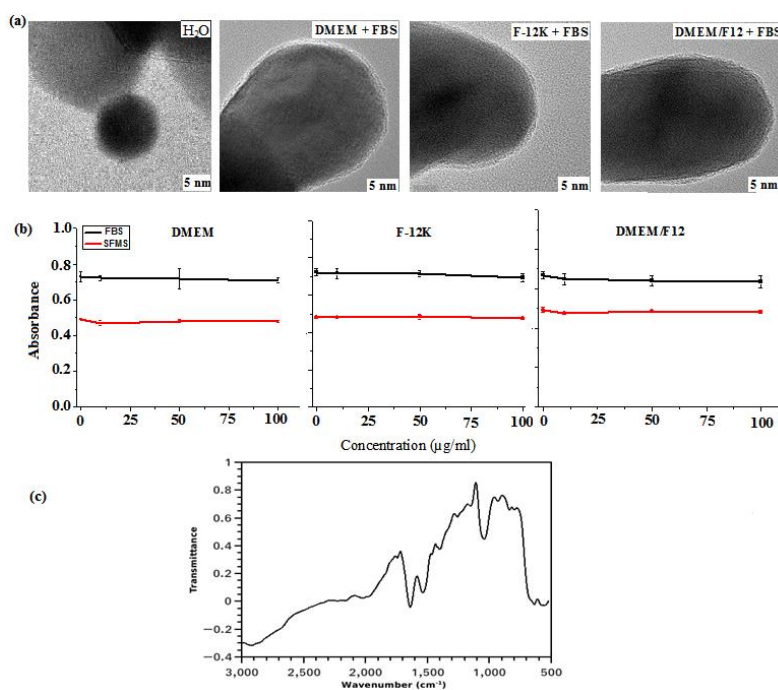


Figure 5-1: *a*) HRTEM photomicrographs of hard protein coronas formed in the various media, supplemented with FBS, after washing. *b*) Protein adsorption ability of SPIONs in the various

media, c) FTIR spectrum of SPIONs immersed in DMEM/F12 cell culture medium containing 10% FBS.

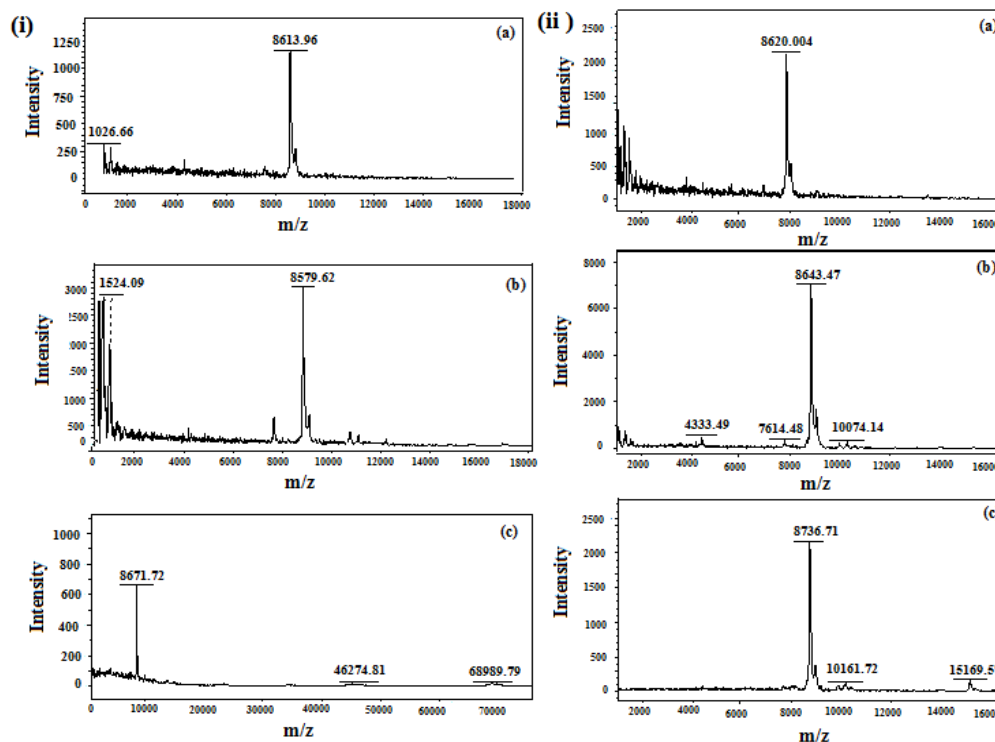


Figure 5-2: MALDI TOF-SIMS spectra of SPIONs after 1h of incubation at 37°C, at concentrations of 50 µg/ml (i) and 100 µg/ml (ii), in the various culture media, supplement with 10% (v/v) FBS: (a) DMEM; (b) DMEM/F12 and (c) F-12K.

After 1 h of incubation, the amount of material ejected from SPIONs exposed to the DMEM/F12 medium is greater than that ejected from SPIONs exposed to the other two media, since the intensities of the peaks for DMEM/F12 are three times higher than for DMEM or F-12K at any concentrations. This confirms the results obtained with the Bradford assay, where the reduction of protein in the culture medium used to suspend the SPIONs was more pronounced for DMEM/F12 than for the other two media (Figure 5-1b).

Figure 5-3 shows spectra from SPIONs after 24 h exposure to 10% FBS and SFMS, respectively. The spectra range from 10 to 70 kDa. The large number of peaks present in these spectra, indicate that many different serum proteins adsorb to the SPION surface with time. As expected, no protein is adsorbed in the case of SFMS (Figure 5-3d).

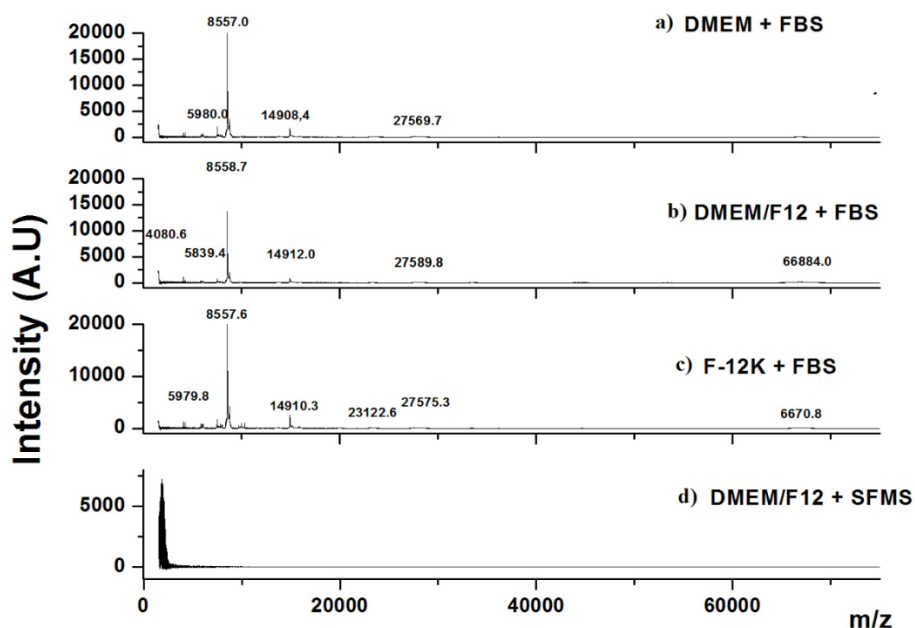


Figure 5-3: MALDI TOF-SIMS spectra of SPIONs after 24h of incubation at 37°C, at a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$, in the various culture media that have been supplemented with 10% (v/v) FBS: (a) DMEM; (b) DMEM/F12 and (c) F-12K. (d) in culture media supplemented with SFMS.

5.4.1.2 Hydrodynamic size distribution

The SPION was initially characterized for its size distribution and zeta potential in water. As seen in Figure 5-4a, the mean particle size and percentage size distribution both increase with concentration in water suspension, and the distributions of particle diameters are not Gaussian at 100 $\mu\text{g/ml}$. Additionally, the shift toward larger size (Figure 5-4a) is accompanied by a decrease in zeta potential (Figure 5-4b).

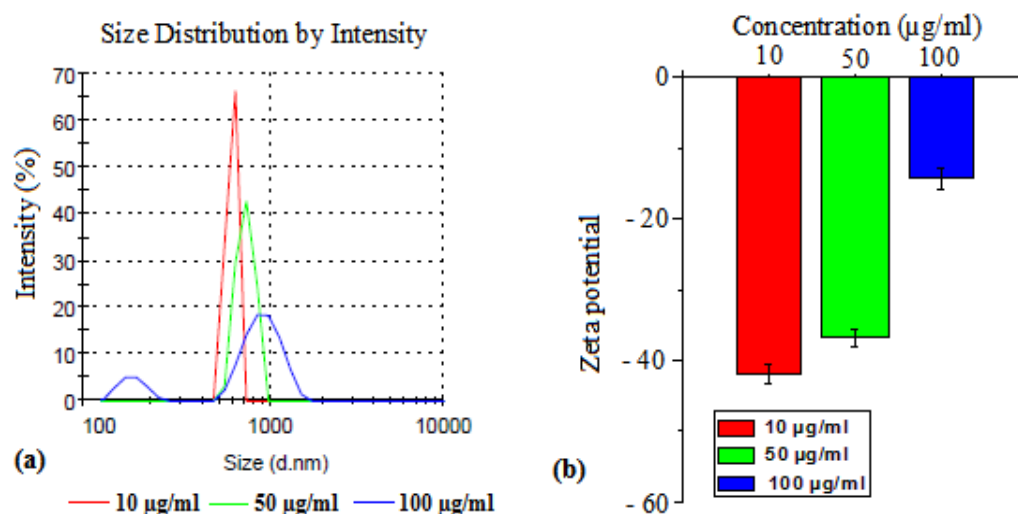


Figure 5-4: Sizes and ζ potentials of SPIONs in water at three concentrations (10, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$); (a) hydrodynamic diameters of SPIONs, measured by dynamic light scattering (DLS); (b) ζ potentials of the same particles, measured by electrophoresis.

The characterizations of SPION interaction with the culture media were performed by suspending the SPIONs in each of them, supplemented with either 10 % FBS or 1.5 % SFMS. Our results show that the hydrodynamic diameter increased in all media, in a concentration-dependent manner (Figure 5-5). However, because of the high ionic strengths of the chemicals dissolved in the culture media, there is no noticeable change of ζ potential from one concentration to another, as shown in Figure 5-6. If we compare the conditions, the diameter increase appears to be less in the presence of FBS than of SFMS, whatever the medium and the concentration, but if we compare the culture media, the SPIONs suspended in DMEM/F12 have a hydrodynamic size smaller than in the other two media.

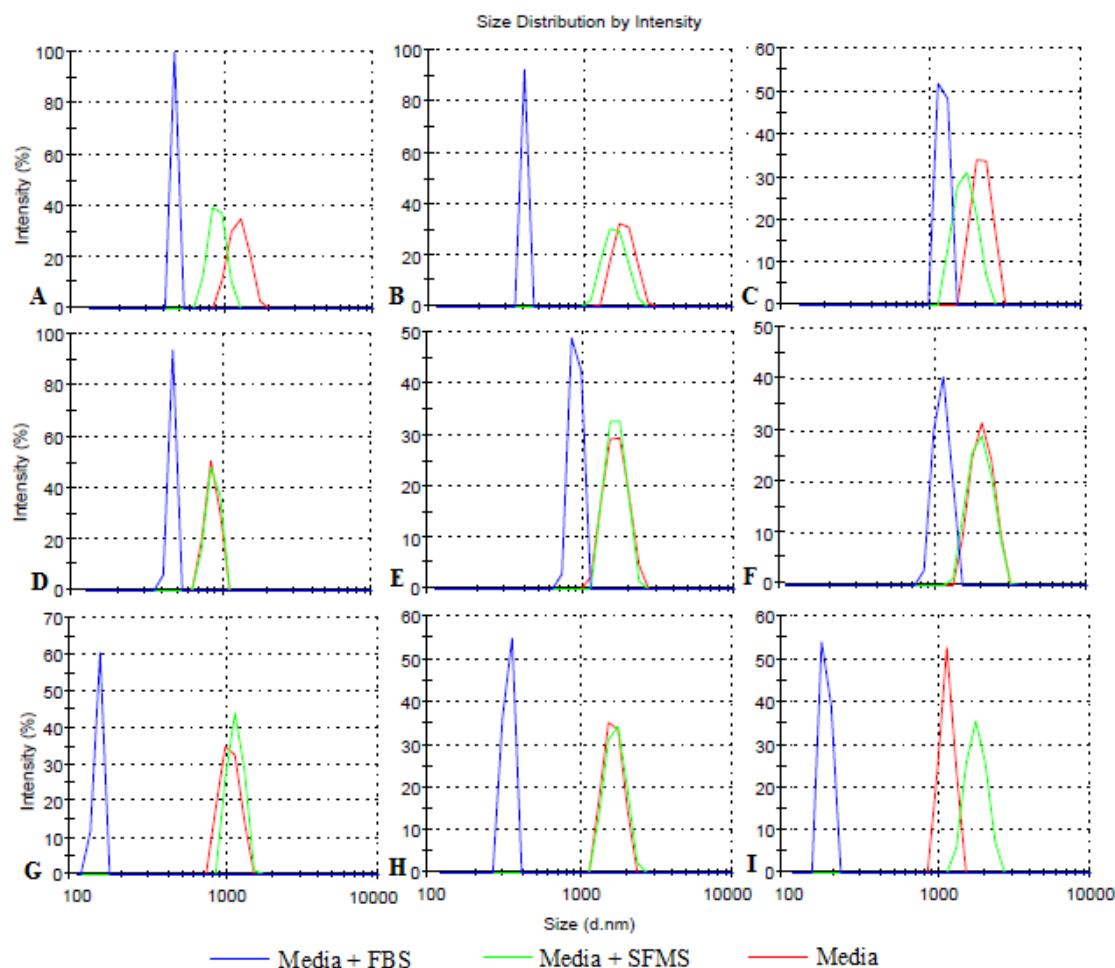


Figure 5-5: Size distribution of SPIONs prepared in DMEM (A-C), F-12 K (D-F), DMEM/F-12 K (G-I) at three different concentrations: A (10), B (50) and(C) 100 $\mu\text{g/ml}$.

5.4.1.3 Zeta potential measurement

These measurements were employed to characterize the SPION surface charges in the various media used (Figure 5-6). They are negatively charged under all conditions, becoming less so when dispersed in the cell culture media, as shown in Figure 5-6. In water, the ζ potential increased with concentration, from -41.9 at 10 $\mu\text{g/ml}$ to -14.3 at 100 $\mu\text{g/ml}$; in the three cell culture media, the changes were more constrained, ranging between -13 and -7.

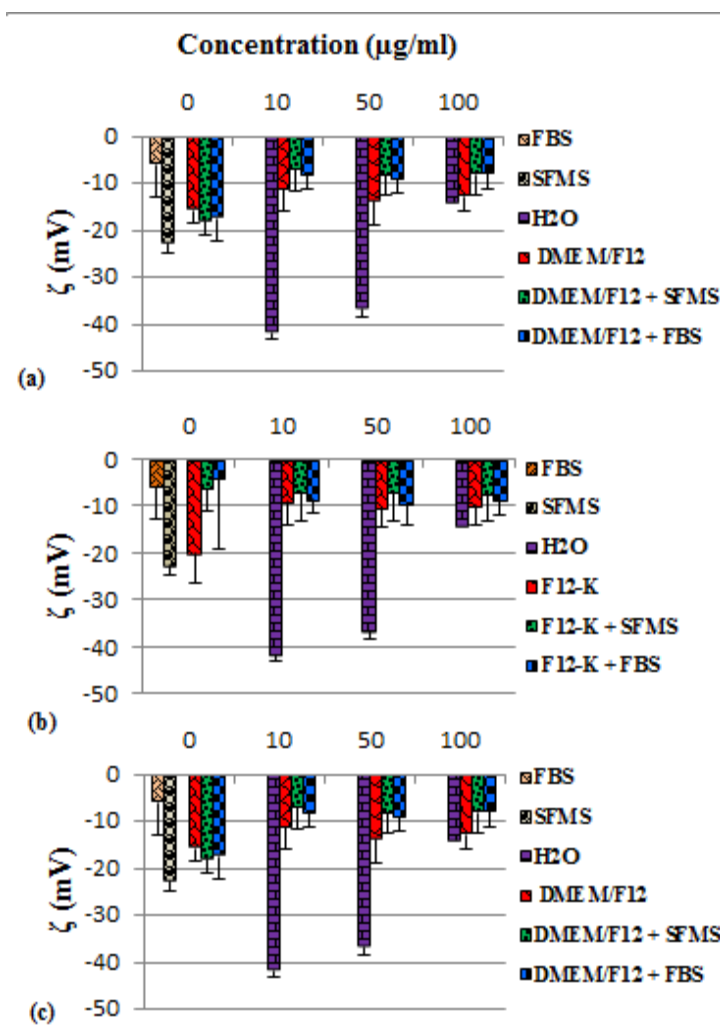


Figure 5-6: ζ potentials of in different dispersion media at concentrations of 10, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$.

This behavior in aqueous solution was explored by determining the isoelectric point (IEP) as a function of SPION concentration. A plot of the IEP as a function of SPION concentration (Figure 5-7) was linear, extrapolating to a pH of ~ 4 at zero concentration, and reaching an upper pH limit of ~ 9 at concentrations of $\sim 150 \mu\text{g/ml}$ and above. It is interesting to note that carboxylic acids have pK_a values of ~ 4 , and that Fe-OH has an IEP of ~ 9 (Kosmulski, 2009). This behavior is explained in the following manner: at infinite dilution, we are measuring the contribution of the partially oxidized hydrocarbon surface layer. In fact, França et al., in their characterization of the presently used SPIONs, found, but did not detail in that article, that the ratio of C-C (285.0 eV) :

C-OH (285.9 eV) : C=O (286.9 eV) : COOH (289.6 eV) = 0.43 : 0.34 : 0.16 : 0.07 (Poulin et al., 2010). As the SPION concentration increases, so does agglomeration, through H-bonding of the COOH groups at the surface, as found in the present work (Figure 5-4a). Such bonding depletes the unbonded COOH groups capable of ionizing, permitting the detection of the ionization of the previously masked Fe-OH groups also present at the surface.

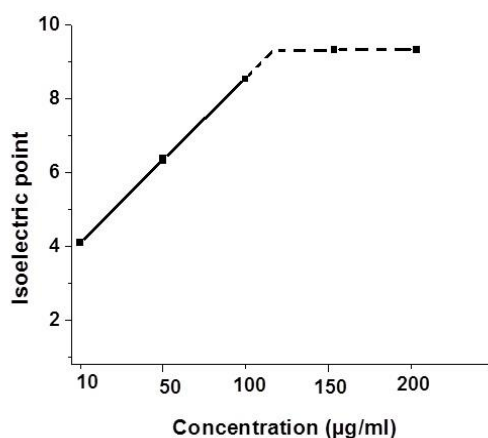


Figure 5-7: Zeta potential measurements of Fe₃O₄ SPIONs in water. The graph indicate the isoelectric point depending on the concentration of Fe₃O₄. We found that the lowest isoelectric point value is around 4 for the concentration less than 10 µg / ml. this value increases with the concentration to reach a plateau at about 9.

5.4.2 Cytotoxicity Assays

The viability of A549 cells was not altered when SPIONs were incubated in DMEM, F-12K or DMEM/F12 culture media, in the presence of FBS, except at 100 µg/ml in DMEM/F12, a concentration that caused an insignificant ($p < 0.05$) decrease in cell viability (Figure 5-8). However, in the presence of SFMS, SPIONs were significantly toxic in F-12K for concentration as low as 50 µg/ml ($p < 0.05$), although not in DMEM or DMEM/F12 (Figure 5-8). There was an insignificant increase in mitochondrial activity at the 100 µg/ml level in DMEM culture media supplemented with SFMS (Figure 5-8-a). Cell-free system analyses indicated that the degree of this interference varied according to the concentration of the SPIONs, with a change in optical density from 0.05 AU for cell culture media without SPIONs, to about 0.200 AU for 100 µg/ml. The data of Figure 5-8 were corrected for this interference.

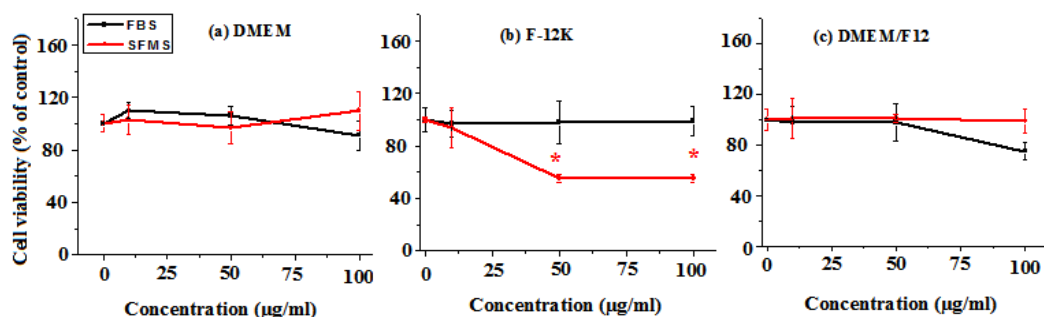


Figure 5-8: Effect of SPIONs on the mitochondrial function of A549 cell incubated for 24 h in three different culture media containing FBS or SFMS. Cells were exposed to different concentrations of SPIONs for 24 h. At the end of the incubation period, mitochondrial function was determined using the MTT reduction assay. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. The asterisk (*) denotes a statistically significant difference from non-treated control ($p < 0.05$).

In contrast to the MTT assay, when assessing cell viability with PrestoBlue, SPIONs showed no cytotoxic effects for A549 cells (Figure 5-9). For the PrestoBlue assay, graphene oxide was used as the positive control. The cell-free system indicated no interference of SPIONs, irrespective of the culture medium used (data not shown). To confirm the PrestoBlue results, we added a third assay, the Trypan Blue exclusion test. The data confirmed that SPIONs cause no deleterious effects in A549 cells; however, there was a significant increase in cell proliferation when cells were incubated with SPIONs in the DMEM/F12K supplemented with FBS ($p < 0.05$), when compared to the two other cell culture media tested (Figure 5-10).

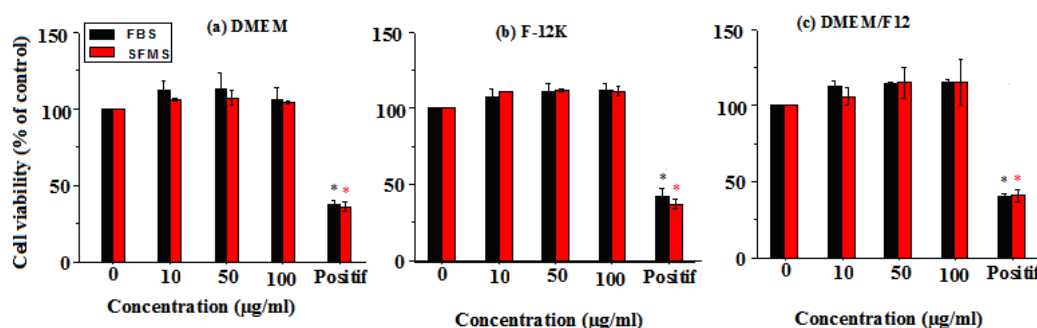


Figure 5-9: Cellular metabolism was determined using the PrestoBlue assay. The concentration of 100 µg/ml of graphene oxide was used as the positive control. There is no significant difference between the control and the SPIONs ($p < 0.05$).

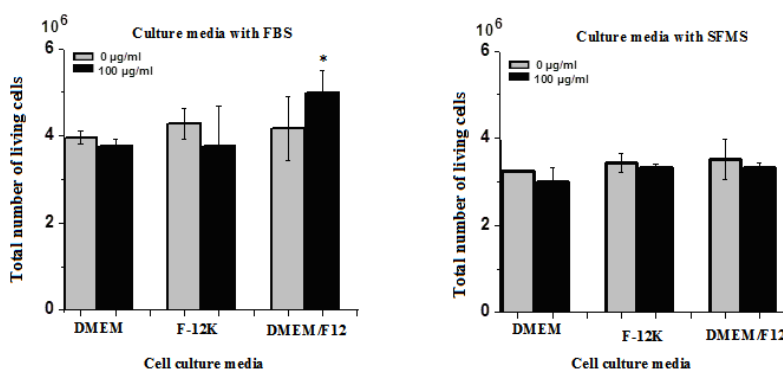


Figure 5-10: Effect of different SPIONs on the viability A549. Cells were treated with a concentration of 100 µg/ml for 24, in the presence of FBS and SFMS, prior to the cell viability being determined by the Trypan Blue exclusion test assay. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. There is no significant difference, compared with the corresponding non-treated control, except in the case of DMEM/F12 with FBS, ($p < 0.05$).

5.5 Discussion

5.5.1 Adsorption of proteins from culture medium

The presence of a protein corona was confirmed using four different techniques. The Bradford analysis showed a substantial decrease in protein adsorption for SPIONs incubated in DMEM/F12 + 10% FBS, compared to either DMEM or F-12K supplemented with FBS. This indicates that the combination of DMEM and F-12K promotes the formation of a more abundant protein corona than either of the individual components, demonstrating that protein adsorption is strongly affected by the composition of the culture medium. As shown in Figure 5-5, hydrodynamic size analysis revealed that this protein adsorption synergy inhibits SPION agglomeration.

TEM photomicrographs (Figure 5-1a) show coatings around SPIONs immersed in the cell culture media containing 10% FBS and FTIR spectra (Figure 5-1c) contained amide I and amide II vibrational peaks. Amide group vibrations of the backbone receive the most attention in protein IR spectroscopy because they are native to all proteins (Ganim et al., 2008). The amide I band ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) is, by far, the most studied because its line shape is sensitive to the type and

amount of secondary structures, and is not strongly influenced by side chains (Barth & Zscherp, 2002). The amide II vibration is an effective solvent probe because it red-shifts 100 cm^{-1} upon deuteration of the amide group. The presence of these vibrations confirms protein adsorption (Cavalu & Simon, 2007).

MALDI TOF-SIMS has permitted the identification of some of these proteins. Figure 5-2 shows very little adsorbed protein after 1 hour of incubation, which corresponds to the very early phase of protein adsorption. A possible explanation for the small number of proteins can be found in the destruction of the weak bonds (soft corona) between proteins and nanoparticles during washing. After 24 h of incubation, the number of adsorbed proteins in the hard corona is higher. While the types of protein adsorbed are almost the same for all cell culture media, the quantities adsorbed differ from one medium to another (Figure 5-3). Literature reports (Qian et al., 2005) were used to interpret the spectra; we tentatively use the attributions of proteins detected in human serum, since such knowledge is unavailable for bovine serum.

One protein found in all spectra appears at 8.5-8.7 kDa. According to the literature (Boyd et al., 2011), it corresponds to apolipoprotein C-II. In addition, we found apolipoprotein A-1, at 27-28 kDa, and apolipoprotein D, at 33 kDa. The highest molecular weight protein detected, with a molecular weight of 66-68.9 kDa, is attributed to albumin, which is the most abundant protein in FBS. While it is expected to be one of the first proteins adsorbing to the SPION surface (Andrade & Hlady, 1986; Vroman, Adams, Fisher, & Munoz, 1980), it is only present in small amounts in all the culture media. After 1h incubation, albumin is adsorbed only from the F-12K culture medium. Immunoglobulin (Ig) chains were also present (23-25 kDa). The peak at 46.2 kDa is attributed to α -1-antitrypsin. There are two other proteins detected, both tentatively assigned to apolipoproteins: these include apolipoprotein C-III (10.2 kDa) and, possibly, apolipoprotein B100 (15.3 kDa). However, the peak at 15.3 kDa has several other possible candidates, including prealbumin (15.7 kDa), and hemoglobin- β fetal chain (15.9 kDa). Remarkably, no apolipoprotein A1 (30.3 kDa), convergently transcribed with apolipoprotein C-III, is detected; this means that apolipoprotein A1 is not adsorbed into the corona, and may have been lost during the conformational changes occurring on corona formation, as seen in Figure 5-1a.

5.5.2 Effects of corona on NP surface properties

The ζ potential becomes more negative as the average hydrodynamic size decreases. The electrostatic repulsive force is then dominant over the van der Waals force, such that agglomeration is suppressed. When the value of the ζ potential approaches 0, this repulsive force is weakened, due to low surface charge, and the hydrodynamic size increases. Under these conditions, agglomeration occurs, and the agglomerate quickly settles out of solution, due to gravitational forces. In this regard, our results show that the SPIONs used in this study agglomerate in all solutions, although they have greater stability in water, with its higher dielectric constant, than in culture media, with or without FBS. The stability of the SPIONs in water is due to the presence, and stabilization, of a highly negatively charged surface, as indicated by the negative ζ potentials (Figure 5-4b), which induce a strong electrostatic repulsion force between particles.

Regarding the effect of culture media, two situations arise. In the first, we observed (Figure 5-5) that the SPIONs aggregated when transferred to all the culture media, without FBS or SFMS. This situation is explained by the suppression of the double layer by the high ionic strengths of the media, which reduces the electrostatic repulsion barrier, as indicated by the drop in the magnitude of the ζ potential (Figure 5-6) from -40 to approximately -10 mV.

In the second situation, the presence of 10% FBS showed a significant reduction in the hydrodynamic sizes of the aggregates, less, even, than that of water at low SPION concentrations (10 $\mu\text{g/ml}$). The adsorption of proteins onto the surfaces of SPIONs had previously been shown to proceed immediately upon contact with physiological fluids; forming a corona around the particles (Lynch & Dawson, 2008). The presence of such a protein corona was demonstrated for our SPIONs, incubated in the three media containing 10% FBS (Figures 5-5). The reduction of the hydrodynamic size in the presence of FBS is consistent with the presence of a corona, which serves to prevent agglomeration (Schulze et al., 2008).

5.5.3 Cytotoxicity

Previous studies used culture media, such as DMEM, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium or DMEM/F12 (Chen, Z. P. et al., 2009; Horie, Nishio, Fujita, Endoh, et al., 2009; Maiorano et al., 2010), supplemented with FBS, along with various techniques used to analyze

the effect of cell culture media on the formation of the corona and its influence on cytotoxicity. We have built on these previous studies. In particular, we used two substantially different culture media (DMEM and F-12K), as well as a third, which is their 1:1 mixture. We also used two types of serum, both natural (FBS) and synthetic (SFMS). In addition, our new characterization techniques complement those previously used. As a result, our results add to, and enlarge upon, those previous studies.

Throughout this study, we maintained a constant cell line (A549) and viability assays (PrestoBlue, Trypan Blue and MTT), and the same experimental conditions, but with different culture media, to assess potential cytotoxicity of SPIONs as a function of difference in corona formation. As noted, the A549 cell line is widely used in the literature and can be grown in the culture media used here (Chairuangkitti et al., 2013; Horie, Nishio, Fujita, Endoh, et al., 2009).

It was previously recommended that the extent of cytotoxicity should be determined using at least two experimental methods, including an assay to assess cellular membrane damage and one to verify cellular reduction change (Kim, H., Yoon, Lee, & Jeong, 2009). The Trypan Blue assay is appropriate for determining the number of cells with/without membrane damage, as is the PrestoBlue assay for assessing relative cell number estimations and mitochondrial dysfunction. According to the cell viability results in Figure 5-9 and 5-10, the SPIONs have no toxicity. Despite this fact, the number of cells in the case of synthetic serum still remains lower than in the presence of FBS.

The absence of toxicity could be explained by the fact that the concentrations tested were not toxic to the cell line A549. The composition of the corona, nearly identical after 1 and 24 h of incubation, could explain why there is no difference in cell viability between the culture media. However, the fact that the SPION in DMEM/F12 proteins adsorb faster, after 1h of incubation, than in the other two media, may promote proliferation, as is indicated in Figure 5-10 (culture media with FBS).

Liu *et al.* showed that the aggregation of CeO₂ NPs increased as a function of initial NP concentration; however, when FBS was added to the DMEM/F12, interactions between NPs and proteins occurred, leading to NP disaggregation (Liu, W. et al., 2013). Our results showed that there is an aggregation of SPIONs, once suspended in culture media, but this was less pronounced in the presence of proteins (FBS); further, the aggregation is greater in the culture

medium alone, as compared to the medium containing SFMS. Due to the presence of van der Waals and electrostatic forces, our SPIONs are prone to form aggregates when dispersed in aqueous buffers. Consequently, different approaches are commonly used to form a reasonably stable suspension, such as suspension in media containing FBS (Geys, Nemery, & Hoet, 2010; Safi, Sarrouj, Sandre, Mignet, & Berret, 2010). Our results show that the composition of the hard corona and the state of aggregation of SPIONs in a cell culture medium are additionally influenced by the composition of the medium, itself. Further, FBS influences the aggregation of SPIONs, which, in turn, influences the cellular response.

Cell-free system experiments revealed that interferences of SPIONs with cell viability assays depend on the composition of the culture media. In our characterizations, we analyzed both the proteins adsorbed and those remaining in the culture medium after adsorption. We found that not only are proteins adsorbed, in the case of culture media containing FBS, but amino acids are also adsorbed, in the case of the same culture media containing SFMS. Based on these observations, our MTT results suggest that it is the corona-coated SPIONs that affect interference.

5.6 Conclusions

At the early stage of adsorption, protein-NP interactions are mediated differently by different culture media, as we found for DMEM, F-12K and DMEM/F12, supplemented with FBS. TEM photomicrographs revealed the conformations of the coronas formed, and DLS, ζ potential, MALDI TOF-SIMS and FTIR data revealed important effects on the status of the SPIONs mediated by these media: first, SPIONs underwent agglomeration upon dispersal in cell culture media, but media enriched with FBS showed a considerable agglomeration reduction, attributed to the formation of the protein corona. In addition, while DMEM/F12 induced a greater protein adsorption, F-12K induced adsorption of a wider variety of proteins, demonstrating that the culture medium influences the proteins that are adsorbed at the short term. The results of our cytotoxicity assays indicate that the SPION concentrations used are not cytotoxic, but it was observed that early stage corona formation can influence cell response. The concentration-dependent SPION interference for the optical measurements, used to determine cellular metabolic activity (MTT), clearly indicate the need for the standardization of cytotoxicity test protocols that consider the use of all experimental parameters, such as the choice of the culture medium, the origin and preparation of serum, and the actual test conditions.

5.7 References

1. M. Auffan, J. Y. Bottero, C. Chaneac and J. Rose, Inorganic manufactured nanoparticles: how their physicochemical properties influence their biological effects in aqueous environments. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 5, 999-1007 (2010).
2. E. Casals, E. Gonzalez and V. F. Puentes, Reactivity of inorganic nanoparticles in biological environments: insights into nanotoxicity mechanisms. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 45 (2012).
3. C. K. Chiang, W. T. Chen and H. T. Chang, Nanoparticle-based mass spectrometry for the analysis of biomolecules. *Chemical Society reviews*, 40, 1269-81 (2011).
4. M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri, J. Zheng, J. D. Clogston, N. Ayub, P. Aggarwal, B. W. Neun, J. B. Hall and S. E. Mcneil, Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 5, 106-17 (2009).
5. J. E. Gagner, S. Shrivastava, X. Qian, J. S. Dordick and R. W. Siegel, Engineering Nanomaterials for Biomedical Applications Requires Understanding the Nano-Bio Interface: A Perspective. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3, 3149-3158 (2012).
6. A. Garland, L. Shen, and X. Y. Zhu, Mobile precursor mediated protein adsorption on solid surfaces. *Progress in Surface Science*, 87, 1-22 (2012).
7. J. K. Jiang, G. Oberdorster and P. Biswas, Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 77-89 (2009).
8. P. Koegler, A. Clayton, H. Thissen, G. N. Santos and P. Kingshott, The influence of nanostructured materials on biointerfacial interactions. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 1820-39 (2012).
9. R. Levy, U. Shaheen, Y. Cesbron and V. See, Gold nanoparticles delivery in mammalian live cells: a critical review. *Nano reviews*, 1 (2010).
10. I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse and K. A. Dawson, The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science

- challenge for the 21st century. *Advances in colloid and interface science*, 134-135, 167-74 (2007).
11. I. Lynch and K. A. Dawson, Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, 3, 40-47(2008).
 12. M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehad, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli and S. Laurent, Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chemical reviews*, 111, 5610-37 (2011).
 13. D. F. Moyano and V. M. Rotello, Nano meets biology: structure and function at the nanoparticle interface. *Langmuir*, 27, 10376-85 (2011).
 14. A. E. Nel, L. Madler, D. Velego, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson, Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8, 543-57 (2009).
 15. A. Pelaz, G. Charron, C. Pfeiffer, Y. Zhao, J. M. DE LA Fuente, X. J. Liang, W. J. Parak and P. Del Pino, Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. *Small*, 9, 1573-84 (2013).
 16. M. Rabe, D. Verdes and S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in colloid and interface science*, 162, 87-106 (2011).
 17. S. Federici, G. Oliviero, D. Maiolo, L. E. Depero, I. Colombo, P. Bergese, On the thermodynamics of biomolecule surface transformations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 375, 1-11 (2012).
 18. S. Rana, Y. C. Yeh and V. M. Rotello, Engineering the nanoparticle-protein interface: applications and possibilities. *Current opinion in chemical biology*, 14, 828-34 (2010).
 19. A. A. Shemetov, I. Nabiev and A. Sukhanova, Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. *ACS nano*, 6, 4585-602 (2012).
 20. A. D. Walkey, and W. C. chan, Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society reviews*, 41, 2780-99 (2012).
 21. N. Welsch, Y. Lu, J. Dzubiella and M. Ballauff, Adsorption of proteins to functional polymeric nanoparticles. *Polymer*, 54, 2835-2849 (2013).
 22. S. T. Yang, Y. Liu, Y. W. Wang and A. Cao, Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein-nanoparticle interactions. *Small*, 9, 1635-53 (2013).

23. A. Pelaz, G. Charron, C. Pfeiffer, Y. Zhao, J. M. DE LA Fuente, X. J. Liang, W. J. Parak and P. DEL pino, Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. *Small*, 9, 1573-84 (2013).
24. R. Franca, X. F. Zhang, T. Veres, L. Yahia and E. Sacher, Core-shell nanoparticles as prodrugs: possible cytotoxicological and biomedical impacts of batch-to-batch inconsistencies. *Journal of colloid and interface science*, 389, 292-7 (2013).
25. K. Natte, J. F. Friedrich, S. Wohlrab, J. Lutzki, R. von Klitzing, W. Österle, G. Orts-Gil. Impact of polymer shell on the formation and time evolution of nanoparticle–protein corona. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104 (2013) 213– 220
26. V.N. Maiorov and G.M. Crippen, Contact potential that recognizes the correct folding of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 227, 876–888 (1992).
27. H.P. Erickson, Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proc Online* 11: 32–51(2009).
28. E. A. Vogler, Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*, 33, 1201-37 (2012).
29. T. Cedervall, i. Lynch, s. Lindman, t. Berggard, e. Thulin, h. Nilsson, k. A. Dawson and S. Linse, Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 104, 2050-5 (2007).
30. X. Jiang, S. Weise, M. Hafner, C. Rocker, F. Zhang, W. J. Parak and G. U. Nienhaus, Quantitative analysis of the protein corona on fept nanoparticles formed by transferrin binding. *Journal of the royal society, interface / the royal society*, 7 suppl 1, s5-s13 (2010).
31. W. J. Stark, Nanoparticles in biological systems. *Angewandte chemie*, 50, 1242-58 (2011).
32. I. Lynch, A. Salvati and k. A. Dawson, Protein-nanoparticle interactions: what does the cell see? *Nature nanotechnology*, 4, 546-7 (2009).
33. D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch and k. A. Dawson, What the cell "sees" in bionanoscience. *Journal of the American chemical society*, 132, 5761-8 (2010).
34. A. Kroll, M. H. Pillukat, D. Hahn and J. Schnekenburger, Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of toxicology*, 86, 1123-36 (2012).
35. M. Pozzolini, S. Scarf, U. Benatti, and M. Giovine. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Analytical Biochemistry* 313, 338–341 (2003).

36. N.A. Monteiro-Riviere, A.O. Inman, L.W. Zhang. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234, 222–235 (2009).
37. S. Poulin, R. Franca, L. Moreau-Belanger and E. Sacher, Confirmation of X-ray Photoelectron Spectroscopy Peak Attributions of Nanoparticulate Iron Oxides, Using Symmetric Peak Component Line Shapes. *Journal of Physical Chemistry C*, 114, 10711-10718 (2010).
38. S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss and J. J. Schlager, In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19, 975-83 (2005).
39. Y. Ge, Y. Zhang, J. Xia, M. Ma, S. He, F. Nie and N. Gu, Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake in vitro. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 73, 294-301 (2009).
40. V. Dousset, C. Delalande, L. Ballarino, B. Quesson, D. Seilhan, M. Coussemacq, E. Thiaudiere, B. Brochet, P. CanionI and J. M. Caille, In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance. *Magnetic resonance in medicine*, 41, 329-33 (1999).
41. R. Wottrich, S. Diabate and H. F. Krug, Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *International journal of hygiene and environmental health*, 207, 353-61 (2004).
42. A. Simon-Deckers, B. Gouget, M. Mayne-L'hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud and M. Carriere, In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in a549 human pneumocytes. *Toxicology*, 253, 137-46 (2008).
43. O. F. Karatas, E. Sezgin, O. Aydin and M. Culha, Interaction of gold nanoparticles with mitochondria. *Colloids and surfaces. B, biointerfaces*, 71, 315-8 (2009).
44. M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).
45. Z. K. Xu, R. Q. Kou, Z. M. Liu, F. Q. Nie and Y. Y. Xu Incorporating alpha-allyl glucoside into polyacrylonitrile by water-phase precipitation copolymerization to reduce protein adsorption and cell adhesion. *Macromolecules*, 36, 2441-2447 (2003).
46. K. Rezwan, L. P. Meier, M. Rezwan, J. Voros, M. Textor and L. J. Gauckler, Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al_2O_3 particles: a new model based on zeta potential and uv-vis measurements. *Langmuir*, 20, 10055-10061 (2004).

47. R. Barbucci, A. Magnani, A. Chiumiento, D. Pasqui, I. Cangioli and S. Lamponi, Fibroblast cell behavior on bound and adsorbed fibronectin onto hyaluronan and sulfated hyaluronan substrates. *Biomacromolecules*, 6, 638-645 **(2005)**.
48. M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehad, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli and S. Laurent, Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chemical reviews*, 111, 5610-37 **(2011)**.
49. P. Kingshott, H. A. W. St john, R. C. Chatelier and H. J. Griesser, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry detection of proteins adsorbed in vivo onto contact lenses. *Journal of biomedical materials research*, 49, 36-42 **(2000)**.
50. H. J. Griesser, P. Kingshott, S. L. Mcarthur, K. M. Mclean, G. R. Kinsel and R. B. Timmons, Surface-maldi mass spectrometry in biomaterials research. *Biomaterials*, 25, 4861-4875 **(2004)**.
51. A. R. Boyd, G. A. burke, H. duffy, M. holmberg, C.O. kane, B. J. meenan, and P. Kingshott, sputter deposited bioceramic coatings: surface characterisation and initial protein adsorption studies using surface-maldi-ms. *Journal of materials science-materials in medicine*, 22, 71-84 **(2011)**.
52. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63 **(1983)**.
53. A. K. Chiang, W. T. Chen and H. T. Chang, Nanoparticle-based mass spectrometry for the analysis of biomolecules. *Chemical Society reviews*, 40, 1269-81 **(2011)**.
54. K. Y. Wang, S. A. Chuang, P. C. Lin, L. S.Huang, S. H. Chen, S. Ouara, W. H. Pan, P. Y. Lee, C. C. Lin and Y. J. Chen, Multiplexed immunoassay: quantitation and profiling of serum biomarkers using magnetic nanoprobe and MALDI-TOF MS. *Analytical chemistry*, 80, 6159-67 **(2008)**.
55. M. Kosmulski. pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach. *Journal of Colloid and Interface Science* 337 439–448 **(2009)**.
56. Z. Ganim, H. S. Chung, A. W. Smith, L. P. Deflores, K. C. Jones and A. Tokmakoff, amide i two-dimensional infrared spectroscopy of proteins. *Accounts of chemical research*, 41, 432-41 **(2008)**.
57. A. Barth and C. Zscherp, what vibrations tell us about proteins. *Quarterly reviews of biophysics*, 35, 369-430 **(2002)**.

58. S. Cavalu and V. Simon, Proteins adsorption to orthopaedic biomaterials: vibrational spectroscopy evidence. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 9, 3297-3302 (2007).
59. W. J. Qian, J. M. Jacobs, D. G. Camp, M. E. Monroe, R. J. Moore, M. A. Gritsenko, S. E. Calvano, S. F. Lowry, W. Xiao, L. L. Moldawer, R. W. Davis, R. G. Tompkins and R. D. Smith, Comparative proteome analyses of human plasma following in vivo lipopolysaccharide administration using multidimensional separations coupled with tandem mass spectrometry. *Proteomics*, 5, 572-84 (2005).
60. L. Vroman, A. L. Adams, G. C. Fisher, P. C. Munoz, Interaction of high molecular weight kininogen, Factor XII and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood*, 55,156–9 (1980).
61. L. Vroman, A.L. Adams, Adsorption of proteins out of plasma and solutions in narrow spaces. *J Colloid Interface Sci*;111, 391–402 (1986).
62. J. D. Andrade, V. Hlady, Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses. *Adv Polym Sci* ,79:1–63 (1986).
63. J. D. Andrade, V. Hlady, Vroman effects, techniques and philosophies. *J Biomater Sci Polym*, 2,161–72 (1991).
64. I. Lynch, and K. A. Dawson, Protein-nanoparticle interactions. *Nano today*, 3, 40-47 (2008).
65. C. Schulze, A. Kroll C. M. Lehr, U. F. Schafer, K. Becker, J. Schnekenburger, C. S. Isfort, R. Landsiedel& W. Wohlleben, Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2, 51-U17 (2008).
66. Z. P. Chen, R. Z. Xu, Y. Zhang and N. Gu, Effects of proteins from culture medium on surface property of silanes- functionalized magnetic nanoparticles. *Nanoscale research letters*, 4, 204-209 (2009).
67. G. Maiorano, S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti, M. A. Malvindi, R. Cingolani, and P. P. Pompa, Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *Acs nano*, 4, 7481-91 (2010).
68. M. Horie, K. Nishio, K. Fujita, S. Endoh, A. Miyauchi, Y. Saito, H. Iwahashi, K. Yamamoto, H. Murayama, H. Nakano, N. Nanashima, E. Niki and Y. Yoshida, Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chemical research in toxicology*, 22, 543-53(2009).

69. H. L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson and L. Moller, Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical research in toxicology*, 21, 1726-32 **(2008)**.
70. P. Chairuangkitti, S. Lawanprasert, S. Roytrakul, S. Aueviriyavit, D. Phummiratch, K. Kulthong, P. Chanvorachote and R. Maniratanachote, Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27, 330-8 **(2013)**.
71. H. Kim, S. C. Yoon, T. Y. Lee and D. Jeong, Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicology letters*, 184, 13-7 **(2009)**.
72. W. Liu, J. Rose, S. Plantevin, M. Auffan, J. Y. bottero and C. Vidaud, Protein corona formation for nanomaterials and proteins of a similar size: hard or soft corona? *Nanoscale*, 5, 1658-68 **(2013)**.
73. M. Safi, H. Sarrouj, O. Sandre, N. Mignet and J. F. Berret, Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state. *Nanotechnology*, 21, 145103 **(2010)**.
74. J. Geys, B. Nemery and P. H. Hoet, Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicology in vitro*, 24, 620-9 **(2010)**.
75. Y. Chang, S. T. Yang, J. H. Liu, E. Dong, Y. Wang, A. Cao, Y. Liu and H. Wang, In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology letters*, 200, 201-10 **(2011)**.

CHAPITRE 6 ARTICLE 3: HUMAN ALVEOLAR EPITHELIAL CELL RESPONSES TO CORE-SHELL SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES (SPIONS)

Doris Antoinette Mbeh¹, Laura Karina Mireles¹, Dimitri Stanicki², Lyes Tabet³, Karim Maghni³, Sophie Laurent², Edward Sacher^{1,4}, L'Hocine Yahia¹.

¹Laboratory for Innovation and Analysis of Bio-Performance, École Polytechnique, C.P. 6079, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3A7 Canada

²Department of General, Organic, and Biomedical Chemistry, Nuclear Magnetic Resonance and Molecular Imaging Laboratory, University of Mons, Mons, Belgium,

³Research Center, Hôpital Sacré-Cœur Montreal, 5400 Boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, H4J 1C5 Canada

⁴Regroupement Québécois de Matériaux de Pointe, École Polytechnique, C.P. 6079, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3A7 Canada.

Submitted to Langmuir on 16 October 2014: Manuscript ID: la-2014-040646

6.1 Abstract

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) have been prepared, and coated with positively ($-\text{NH}_3^+$) and negatively ($-\text{COO}^-$) charged shells. These NPs, as well as their “bare” precursor, which actually contain surface hydroxyl groups, have been characterized *in vitro*, and their influence on a human epithelial cell line has been assessed in terms of cell metabolic activity, cellular membrane lysis, mitochondrial activity and reactive oxygen species production. Their physicochemical characterizations and protein-nanoparticle interactions have been determined, using dynamic light scattering, high resolution transmission electron microscopy, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) spectrometry, and

Coomassie Blue fast staining. Cell–SPION interactions have been determined by PrestoBlue resazurin-based, Trypan Blue dye exclusion-based, and MTS cell proliferation assays, as well as by reactive oxygen species determination. The results show that different surface characteristics cause different protein corona and cell responses. Some proteins (e.g., albumin) are adsorbed only on positively charged coatings and others (e.g., fibrinogen), only on negatively charged coating. No cell deaths occur, but cell proliferation is influenced by surface chemistry. Proliferation reduction is dose-dependent, and highest for bare SPIONs. Negatively charged SPIONs were the most biocompatible.

6.2 Introduction

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), with appropriate surface chemistries, have been widely used in numerous *in vivo* applications, such as magnetic resonance imaging contrast enhancement(Fukuda et al., 2006; Peng, X. H. et al., 2008; Yang, H. et al., 2011). tissue repair(Xu, H. H., Smith, & Simon, 2004) immunoassays, detoxification of biological fluids(Gupta, A. K. & Gupta, 2005b), hyperthermia(Sonvico et al., 2005; Zhao, D. L., Zeng, Xia, & Tang, 2009), drug delivery(Chen, D. Y. et al., 2010; Ling, Wei, Luo, Gao, & Zhong, 2011; Zhang, Y., Kohler, & Zhang, 2002) and cell separation(Schoepf, Marecos, Melder, Jain, & Weissleder, 1998; Weissleder, Cheng, Bogdanova, & Bogdanov, 1997).

All these applications require special surface coating that are not only non-toxic and biocompatible, but also permit targeted delivery to a chosen area of the body. The natures of surface coatings, and their subsequent geometric arrangements on the SPIONs, determine not only the overall size of the particle, but also play a significant role in biokinetics, opsonisation and distribution in the body. SPIONs are composed of a magnetic core, are generally spherical, and have a silica shell produced from the hydrolysis of orthoesters of silicic acid, such as aminopropyltriethoxysilane (APTES), carboxyethylsilanetriol (CES) (Subbiahdoss et al., 2012), N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (TPED) (Lin, Chen, Lin, Chen, & Chiou, 2011) and 3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride (TEPSA) (Stanicki et al., 2014). The formation of amino- or carboxylic acid-functionalized SPIONs is a critical step in covalently linking SPIONs to biomolecules, where the functionalizations act as covalent bridges. The cellular interaction of SPIONs is one of the challenges in current nanotoxicological research programs(Dusinska et al., 2009; Kim, J. E., Shin, & Cho, 2012; Unfried et al., 2007). Although a variety of preclinical

studies dealing with SPION cytotoxicity exist in the recent literature, conclusions concerning the toxicity of a particular SPION should be viewed cautiously, due to the complexity of the mechanisms determining the potential interactions at the SPION-cell and/or SPION-extracellular matrix interfaces(Dusinska et al., 2009). To our knowledge, there are several physicochemical metrics that must be addressed in SPION-induced cytotoxicity effects. These include size and size distribution, shape, topology, molecular weight, the state of aggregation or agglomeration, extent of purity, impurity profiles, chemical composition, stability and, especially, surface characterization(Albanese, Tang, & Chan, 2012; Choi & Choy, 2011; Hong et al., 2011; Singh, S. K. et al., 2011).

With each new development in nanotoxicological research, it becomes clearer that some critical determinants of the biological behavior of functionalized SPIONs are to be found in both their surface and core features. One should be aware that the surface properties related to different functional components at the SPION surface may modulate some cytotoxic effects, as has been reported in normal and cancerous mammalian cells(Grudzinski et al., 2014; Kai, Xiaojun, Ximing, Zhenqing, & Qiqing, 2011). It is well recognized that, on contact with a biological medium, SPION surfaces are immediately covered by various types of proteins(Mahmoudi, Lynch, et al., 2011). This adsorption confers a new “biological identity” to the SPION, which determines the subsequent cellular/tissue response(Rahman, Laurent, Tawil, Yahia, & Mahmoudi, 2013). The composition and quantity of both soft and hard protein coronas are strongly dependent on the surface properties of the SPIONs and the composition of the biological milieu. Therefore, the proper *in vitro* toxicity assessment of SPIONs requires their comprehensive physicochemical characterization by multi-parametric biological studies that cover the broad spectrum of SPION-cell interactions.

Our laboratory is developing an inhalable SPION-based prodrug capable of delivering nitric oxide (NO). The reason is that, during surgery, pulmonary hypertension and its deleterious effects may be aggravated by the release of vasoactive substances, during cardiopulmonary bypass (CPB), by a reduction of endogenous NO or by the obligatory myocardial ischemia(Seghaye et al., 1997; Solina et al., 2000). In this scenario, inotropes, pulmonary vasodilators, or inodilators (inotropes with pulmonary vasodilatory properties) are frequently used to facilitate separation from CPB. These agents are all nonspecific vasodilators, and invariably result in a degree of systemic vasodilation that often necessitates therapeutic

intervention with vasopressors. The therapeutic utility of inhaled NO derives from its specificity as a pulmonary vasodilator, as well as its attendant beneficial effect on pulmonary ventilation/perfusion dynamics. However, NO has a short *in vivo* half-life, of the order of seconds. In an attempt to develop NO donors that could provide controlled and prolonged NO release, several types have been designed and evaluated, both *in vivo* and *in vitro* (Jo et al., 2009; Kim, J. et al., 2011; Seabra et al., 2007; Shin, Metzger, & Schoenfisch, 2007; Zhou, Annich, Wu, & Meyerhoff, 2006). Our group previously reported (Zhang, X. F. et al., 2012a) how Fe₃O₄-silica core-shell SPIONs were synthesized so as to chemically store and release NO, by functionalizing the silica shells with S-nitrosothiols that spontaneously release NO through the homolytic bond cleavage of the S-N bond under physiological conditions. The delivery of NO molecules at specific tissue sites that provide therapeutically effective release, while reducing any toxic side-effects of the delivery vehicles, still remains challenging. The best delivery vehicle should integrate biocompatibility, targeting and controlled release.

In this study, we synthesized two potential NO carriers, analyzed their physicochemical characteristics and evaluated their biocompatibility at every stage of their functionalization. Monodisperse SPIONs were synthesized by the polyol method (Forge et al., 2008), and functionalized with either 3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride (TEPSA) or *N*-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (TPED), bearing, respectively, COOH (on anhydride hydrolysis) and NH₂ groups. These surface groups have many advantages (Barick, Aslam, Prasad, Dravid, & Bahadur, 2009), among them endowing the SPIONs with good water dispersibilities while oppositely charged.

To aid in our choice of the appropriate coating for NO attachment, we considered the biocompatibility effects of unfunctionalized (“bare”) and functionalized SPIONs on epithelial alveolar cells, to determine how such effects depend on the surface groups present. Metabolic activity, cellular membrane toxicity, mitochondrial activity and reactive oxygen species were examined, and were interpreted as functions of SPION size, shape, zeta potential, hydrodynamic diameter distribution, corona composition and surface characteristics.

6.3 Materials and methods

6.3.1 Chemical Reagents

Ferric chloride solution (FeCl_3 , 45%), ferrous chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) and sodium hydroxide were purchased from Fluka; diethyleneglycol (DEG), dimethylformamide (DMF), acetone, diethyl ether and *N*-[3-(trimethoxysilyl)propyl] ethylenediamine were purchased from Sigma-Aldrich; 3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride was purchased from ABCR Chemicals. All were used without further purification. Ultrafiltration membranes (MWCO = 30 kDa) were purchased from Millipore.

Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12 mixture (DMEM/F12) and PrestoBlue reagent were purchased from Life Technology; L-glutamine, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, Trypan Blue and DCFH-DA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate) powder were purchased from Sigma-Aldrich, the reduced GSH kit was purchased from Cayman, the Coomassie Blue dye was purchased from Bio-Rad and the MTS kit was purchased from Promega.

6.3.2 Synthesis of SPIONs

6.3.2.1 Preparation of bare Fe_3O_4

Bare SPIONs were prepared by co-precipitation of iron salts in DEG according to a protocol previously described (Forge et al., 2008). Briefly, a mixture of ferrous chloride tetrahydrate (45 mmol, 8.9 g) and ferric chloride (45%, 9.1 ml, 37 mmol) in DEG (250 ml) was heated at 170°C under nitrogen while stirring. After 15 min of heating, 15 g of solid sodium hydroxide were added. The solution was stirred for 1 h at 170°C, before being cooled. The SPIONs were isolated from the solution by magnetic decantation, after which the black precipitate was washed five times with aqueous nitric acid (200 ml, 1 M). Finally, the SPIONs were dispersed in deionized water, sonicated for 45 minutes, and centrifuged (16,500 G) for 45 minutes to remove aggregates.

6.3.2.2 Preparation of Fe₃O₄@NH₂.

TPED (50 mmol, 10.8 ml) was slowly added to an aqueous suspension of SPIONs (200 ml; [Fe] = 25 mM) at 50°C. The mixture was then heated at reflux for 2 hours. After cooling, the suspension was purified by membrane filtration (MWCO = 30 kDa) and finally centrifuged (16,500 g) for 45 minutes.

6.3.2.3 Preparation of Fe₃O₄@COOH.

Briefly, TEPSA (7.1 ml, 25 mmol) was slowly added to a suspension of NPs in DMF (50 ml; [Fe] = 100 mM). Water was then added (4.3 ml), followed by an aqueous solution of TMAOH (1 M; 2.5 ml, 2.5 mmol), at room temperature, under stirring. The solution was heated at 100°C for 24 h, under continuous stirring. The SPIONs were collected after pouring the suspension into an acetone/diethylether mixture, followed by magnetic decantation. After washing with acetone, the black precipitate was dispersed in water and purified by membrane filtration (MWCO = 30 kDa), and finally centrifuged (16,500 g) for 45 minutes.

6.3.3 Particle Characterization

The morphologies and size distributions of the three SPIONs were investigated by high resolution transmission electron microscopy (HRTEM). The hydrodynamic size distribution and zeta potential of the particles were performed on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), using a HeNe laser (633 nm), at 25°C. The zeta potential was determined as a function of pH (ranging from 2.0 to 13.0), by means of a Multi Purpose Titrator, Malvern Instruments, using solutions of HNO₃ and NaOH. The zeta potentials of the three SPION, suspended in phosphate-buffered saline (PBS), DMEM/F12, DMEM/ F12 containing a synthetic serum (SFMS) and DMEM/F12 containing fetal bovine serum (FBS), were also determined.

6.3.4 Protein Adsorption onto the SPIONs

For protein binding studies, the three SPIONs were incubated with the cell culture medium, supplemented with 10 % FBS, for 24 h at 37°C. After incubation, the SPIONs were separated from the solution by centrifugation, and the supernatant solution was analyzed, using the Bradford assay, to determine the unbound protein concentration (Lu, Li, Huang, & Zhang, 2007;

Pareek, Gillgren, & Jonsson, 2013). All the measurements were carried out in triplicate, and the average values are presented.

To identify the adsorbed proteins, the pellet obtained after centrifugation was washed in water three times, and analyzed by MALDI-TOF SIMS (Chang, S. Y. et al., 2007; Mbeh et al., 2014). Briefly, the pellet obtained after the washing step was resuspended in 15 μ l of 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich). Five μ l of the suspension were deposited onto a stainless steel target and 1 μ l of the matrix solution (a saturated solution of sinapinic acid (Fluka) in 1:1 acetonitrile:0.1% trifluoroacetic acid) was applied onto the SPIONs, and dried before analysis.

6.3.5 Cytotoxicity Assay

6.3.5.1 Cell culture

The A549 human lung epithelial cancer cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). They were routinely cultured in DMEM/F12, supplemented with L-glutamine, 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. These cells were maintained in a T25 cell culture flask, at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere and harvested at 80% confluency, using trypsin/ethylenediaminetetracetic acid. Harvested cells were counted, using the Trypan Blue direct counting assay, and subsequently diluted to a concentration of 5×10^4 cells ml⁻¹.

6.3.5.2 Trypan Blue dye exclusion assay.

The viable cell percentages were measured by Trypan Blue dye, staining those cells having intact membranes. A549 cells were cultured in a 12-well plate, at a density of 1×10^5 cells per well. The various SPIONs were introduced, at five different concentrations (50, 100, 500, 1000 and 2000 μ g/ml), into culture medium with or without serum, and incubated for 24 h. After incubation, the supernatant and adherent cells were evaluated by the Trypan Blue assay (Martin-Piedra et al., 2014; Mickuviene, Kirveliene, & Juodka, 2004). Briefly, 100 μ l of each supernatant were mixed with 20 μ l of Trypan Blue. The adherent cells were detached by trypsin and resuspended in the culture medium containing FBS. One hundred μ l of this suspension were mixed with 20 μ l of the Trypan Blue solution. The numbers of living and dead cells were counted by hemacytometer. The viability values were derived by the following equation, and compared with the negative control:

Viable cells (%) = number of viable cells x100/(number of viable cells + number of nonviable cells).

6.3.5.3 PrestoBlue cell metabolism assay.

We evaluated the influence of all the SPIONs on cellular metabolism with the resazurin-based PrestoBlue (PB) assay. This assay is commercially available, and comes ready to use (Boncler, Rozalski, Krajewska, Podsedek, & Watala, 2014). Metabolically active cells are capable of reducing the PrestoBlue reagent, with the colorimetrically measured change used to quantify cell viability. Our assay was performed according to the manufacturer's protocol. A549 cells were seeded into 96-well plates, at a density of 5×10^3 per well, in 200 μ l of cell culture medium, and incubated for 24 h to allow cell adherence. Cells were then incubated in the presence or absence of each of the SPIONs, in 100 μ l of cell culture medium, for 24 h. Untreated cells were used as negative controls and cadmium telluride quantum dots were used as positive controls because they are not corrosive when in contact with culture media, and are considered extremely toxic (Nguyen, Seligy, & Tayabali, 2013). Cell culture media, with different concentrations of SPIONs, were used to substantiate any interferences phenomena. Cell metabolism was measured according to the manufacturer's instructions. Briefly, the PB solution (10 μ l) was added to each well after 24 h exposure; plates were then returned to the incubator for 30 min, after which 100 μ l were transferred to a black well plate. Fluorescence readings of the wells were recorded by a Cytofluor fluorescence multiwell plate reader (Series H4000, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA), with excitation at 530 nm and emission at 580 nm. Unfortunately, PrestoBlue underwent a dose-dependent interference at higher SPION concentrations, necessitating another, non-fluorometric assay.

It should be noted that colorimetric and fluorometric dyes are proving to be problematic when incorporated into assays along with NPs. There is increasing evidence that certain NPs interact with these agents, leading to interferences which cause false absorbance or fluorescence results (Doak et al., 2009).

6.3.5.4 MTS assay to evaluate mitochondrial activity.

MTS was chosen for this study, due to the solubility of the reduced product in culture medium and because our coated SPIONs were found to interfere with the PrestoBlue assay. The effect of SPION exposure on cell metabolic activity was evaluated using the commercial MTS assay (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay), according to the manufacturer's procedure. The detection reagents used for this study were composed of solutions of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate, PMS), which is required as a redox intermediary, in a ratio of 20:1 MTS:PMS. The assay is based on the conversion of MTS into the soluble, colored formazan product by mitochondrial dehydrogenase enzymes in metabolically active cells, at 37°C. The amount of formazan produced by dehydrogenase enzymes is directly proportional to the number of living cells in the culture, and can be measured at 490 nm. Briefly, A549 cells were seeded in each well of a 96-well plate, at a density of 5×10^3 per well and fed with complete medium for 24 h. Cells were then exposed to SPIONs for another 24 h, before being washed twice; 20 μ l of MTS:PMS reagents were then added to 80 μ l of fresh medium and further incubated. After 1-2 h, the absorbance of colored product was measured at 490 nm, using an automated plate reader (Safire2, Tecan, Switzerland). The relative cell metabolic activity (%), related to control wells containing cell culture medium only, was calculated using the relationship:

$$\text{Relative cell metabolic activity (\%)} = (A_{\text{test}} - A_{\text{CFtest}}) \times 100 / (A_{\text{control}} - A_{\text{CFcontrol}}),$$

where A_{test} is the absorbance of treated cells (sample), A_{control} is the absorbance of untreated cells (control), A_{CFtest} is the absorbance of a SPIONs dispersion in cell-free medium, and $A_{\text{CFcontrol}}$ is the absorbance of cell-free medium.

6.3.6 Determination of reactive oxygen species (ROS)

To measure ROS generation, a fluorometric assay was performed, using the intracellular oxidation of 2,7-dichlorohydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Elbekai & El-Kadi, 2005; Fotakis, Cemeli, Anderson, & Timbrell, 2005). A549 cells were cultivated in 96-well plates, at a

density of 5×10^3 cells/well, and were allowed to grow for 24 h. After removing the medium, the cells were incubated for another 24 h with cell culture media that containing bare Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ or $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$, at concentrations of 100, 1000 and 2000 $\mu\text{g/ml}$. The cells were then washed with PBS, and loaded with 100 μl of DCFH-DA (20 μM) in DMEM/F12 with 5% of FBS, for 30 min. Following this, the supernatant was transferred to a black well plate. Cells were washed with PBS, lysed with 1 M NaOH, resuspended in DMEM/F12 and transferred to the black well plate. Following this, the fluorescence of dichlorofluorescein (DCF), which is the oxidation product of DCFH-DA, was measured using the GeminiXPS microplate spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), with excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. The intensity values were related to those obtained from fluorescence measurements of cells exposed to t-butyl-hydroperoxide (tBHP), used as a positive control.

6.4 Results

6.4.1 Particle Characterization

The easily dispersed SPIONs, with a narrow size distributions, are seen in Figure 6-1i, a-c. The standard deviation of the mean size was less than 10%, in all cases (Figure 6-1ii, a-c). Hydrodynamic diameters of 9.3 ± 1.4 , 10.1 ± 1.3 and 10.4 ± 1.6 nm were obtained for bare Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$, respectively (Figure 6-2a).

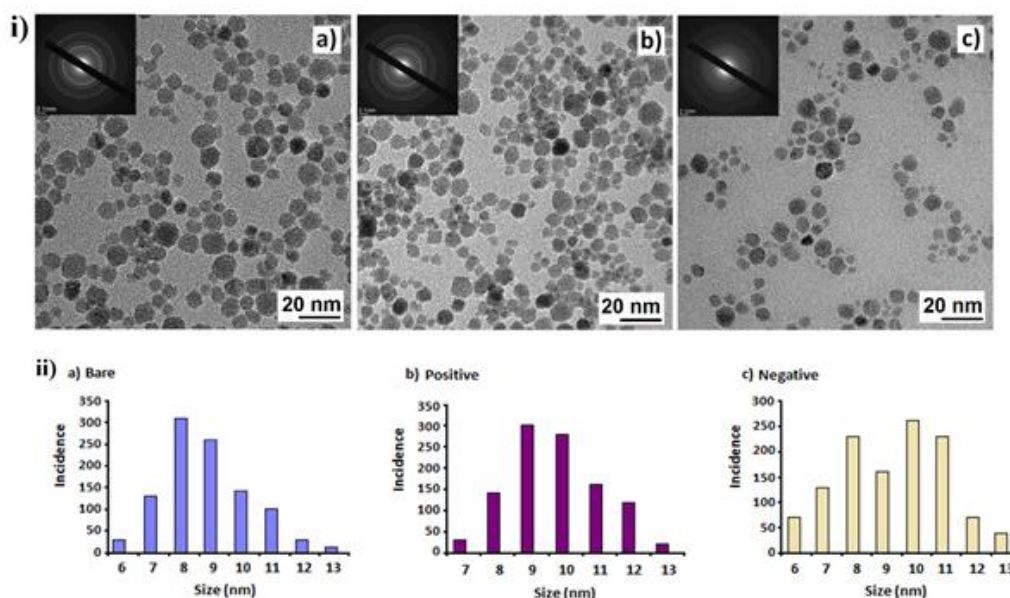


Figure 6-1: i) HRTEM images of a) Fe₃O₄, b) Fe₃O₄@NH₂ and c) Fe₃O₄@COOH SPIONs; ii) Size distributions of a) Fe₃O₄, b) Fe₃O₄@NH₂ and c) Fe₃O₄@COOH SPIONs.

The difference between the sizes of bare and coated SPIONs is attributed to the coating contributions, ~ 0.4 and 0.55 nm for Fe₃O₄@NH₂ and Fe₃O₄@COOH, respectively. The particles used in this study exhibit narrow size distributions (Figure 6-2a). Zeta potential measurements were used to determine the charges of the SPIONs in different environments and to estimate isoelectric points (IEPs); the IEP is the pH at which there is zero total charge on the SPION surface. This was performed to investigate the surface charges, before and after incubation in different physiological media and DMEM/F12 cell culture medium, with or without serum.

In Figure 6-2b, the surface charges in water, at physiological pH (7.4), were -25 mV for bare Fe₃O₄, $+35$ mV for Fe₃O₄@NH₂ and -40 mV for Fe₃O₄@COOH; the IEP of bare Fe₃O₄ occurs at pH 6.1, which is in accordance with literature values (Liu, J. F., Zhao, & Jiang, 2008), while Fe₃O₄@NH₂ had an IEP of 9.5, the pK_a of amines, and is attributed to their presence on the surface (Rosenholm & Linden, 2008), and Fe₃O₄@COOH had a much lower IEP of 3.5, which is the pK_a of carboxylic acids, present on the surface.

The difference between the sizes of bare and coated SPIONs is attributed to the coating contributions, ~ 0.4 and 0.55 nm for Fe₃O₄@NH₂ and Fe₃O₄@COOH, respectively. The particles

used in this study exhibit narrow size distributions (Figure 6-2a). Zeta potential measurements were used to determine the charges of the SPIONs in different environments and to estimate isoelectric points (IEPs); the IEP is the pH at which there is zero total charge on the SPION surface. This was performed to investigate the surface charges, before and after incubation in different physiological media and DMEM/F12 cell culture medium, with or without serum.

In Figure 6-2b, the surface charges in water, at physiological pH (7.4), were -25 mV for bare Fe_3O_4 , +35 mV for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and -40 mV for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$; the IEP of bare Fe_3O_4 occurs at pH 6.1, which is in accordance with literature values (Liu, J. F. et al., 2008), while $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ had an IEP of 9.5, the pK_a of amines, and is attributed to their presence on the surface (Rosenholm & Linden, 2008), and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ had a much lower IEP of 3.5, which is the pK_a of carboxylic acids, present on the surface.

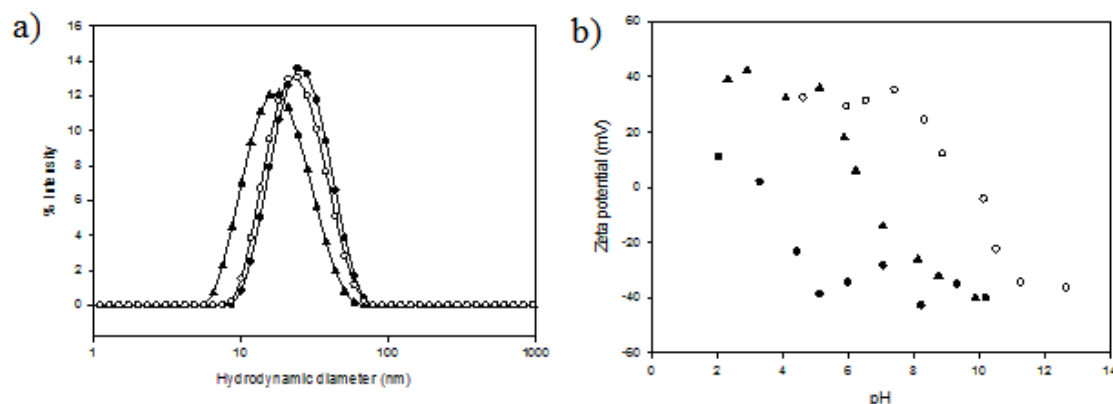


Figure 6-2: (a) Size distribution of Fe_3O_4 (filled triangles), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ (filled circles) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ (empty circles). (b) Evolution of the zeta potential with pH for Fe_3O_4 (filled triangles), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ (filled circles) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ (empty circles).

However, there are changes in their surface charge on incubation in different physiological environments, as shown Figure 6-3. Bare Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ are both negatively charged in all the physiological media used in this study, i.e., PBS, DMEM/F12 without serum, DMEM/F12 with synthetic serum and DMEM/F12 with 10 % FBS. However, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ remains positively charge in PBS and DMEM/F12 with synthetic serum, while becoming negatively charged in both DMEM/F12 without serum and DMEM/F12 with 10 % FBS.

At a SPION concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$, the absolute value of the charge on bare Fe_3O_4 is slightly greater than that of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$, when they are in both PBS and DMEM/F12 containing 10% FBS. However, this value is greater for the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ in DMEM/F12 culture medium without serum, and in DMEM/F12 with synthetic serum.

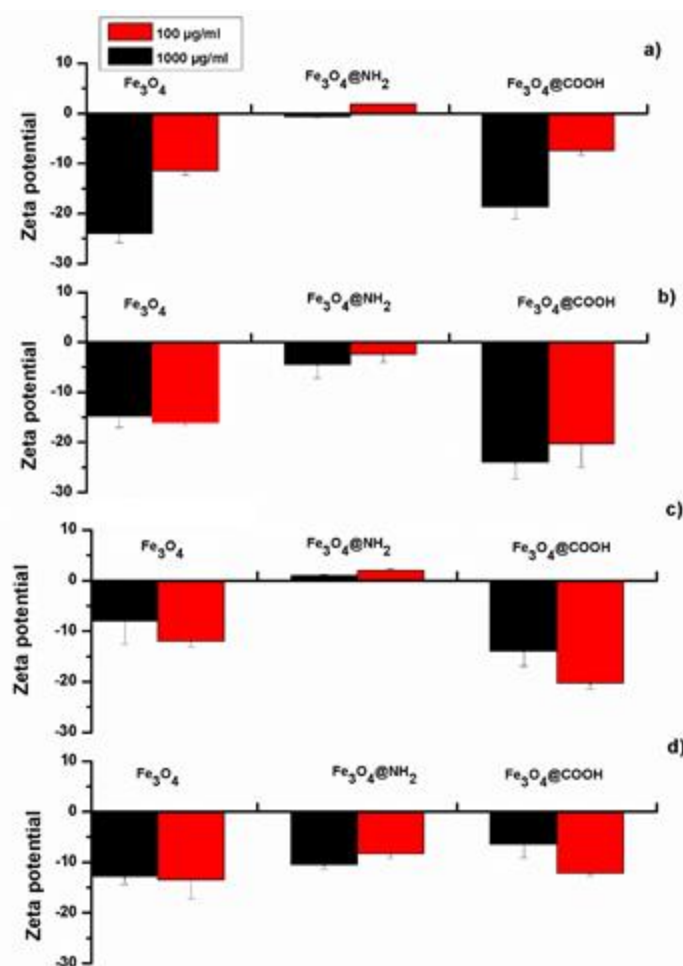


Figure 6-3 : Zeta potentials of nanoparticles in (a) PBS, (b) DMEM/F12, (c) DMEM/F12 + SFMS and (d) DMEM/F12 + FBS, at concentrations of 100 and 1000 $\mu\text{g/ml}$.

The main factor systematically considered in this study is the surface chemistry of the SPIONs, and how it dictates the interaction between SPION and serum proteins. The quantitative analysis of protein adsorption by the Bradford assay confirms that such adsorption occurs on the three SPIONs (Figure 6-4). However, the quantities adsorbed do not show a significant difference among SPION types. Figure 6-5 shows MALDI TOF-SIMS spectra obtained with SPIONs incubated with culture media supplemented with 10 % FBS for 24 h. They indicate the types and

the relative amounts of the major proteins adsorbed. On comparison, we find proteins that adsorb on all three types of SPIONs (an unidentified protein with a molecular weight of ~ 4 kDa, aprotinin with a molecular weight of ~ 7.5 kDa and a monomeric α subunit of bovine hemoglobin (bHb) with a molecular weight of ~ 14.8 kDa). However the amounts adsorbed vary from one type of SPION to another.

We also find that there are proteins adsorbed on only the amine coating (Figure 6-5.b): recombinant human TFF1 (~ 7.9 kDa), the monomeric β subunits of bHb (~ 15 kDa) and albumin (~ 67 kDa). Apolipoprotein A II (~ 8.5 kDa), is adsorbed on the carboxylic acid coating. Ribonuclease (~ 13.7 kDa) is found on only the bare material (Figure 6-5.a), and α -fibrinogen (~ 5.9 kDa) is found on both bare and carboxylic acid-coated materials.

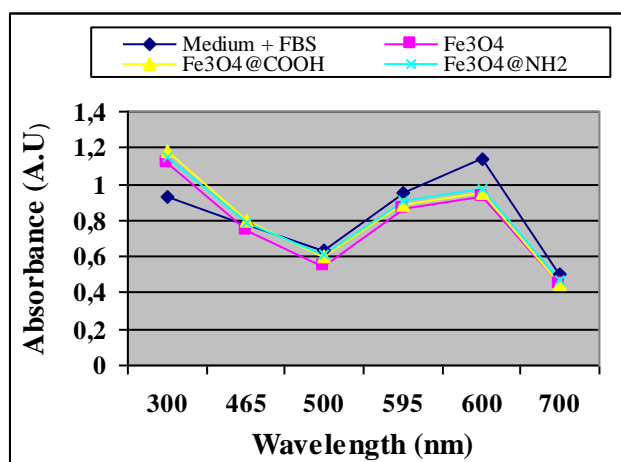


Figure 6-4: Protein adsorption capacities of the three SPIONs via the Coomassie Blue fast staining method.

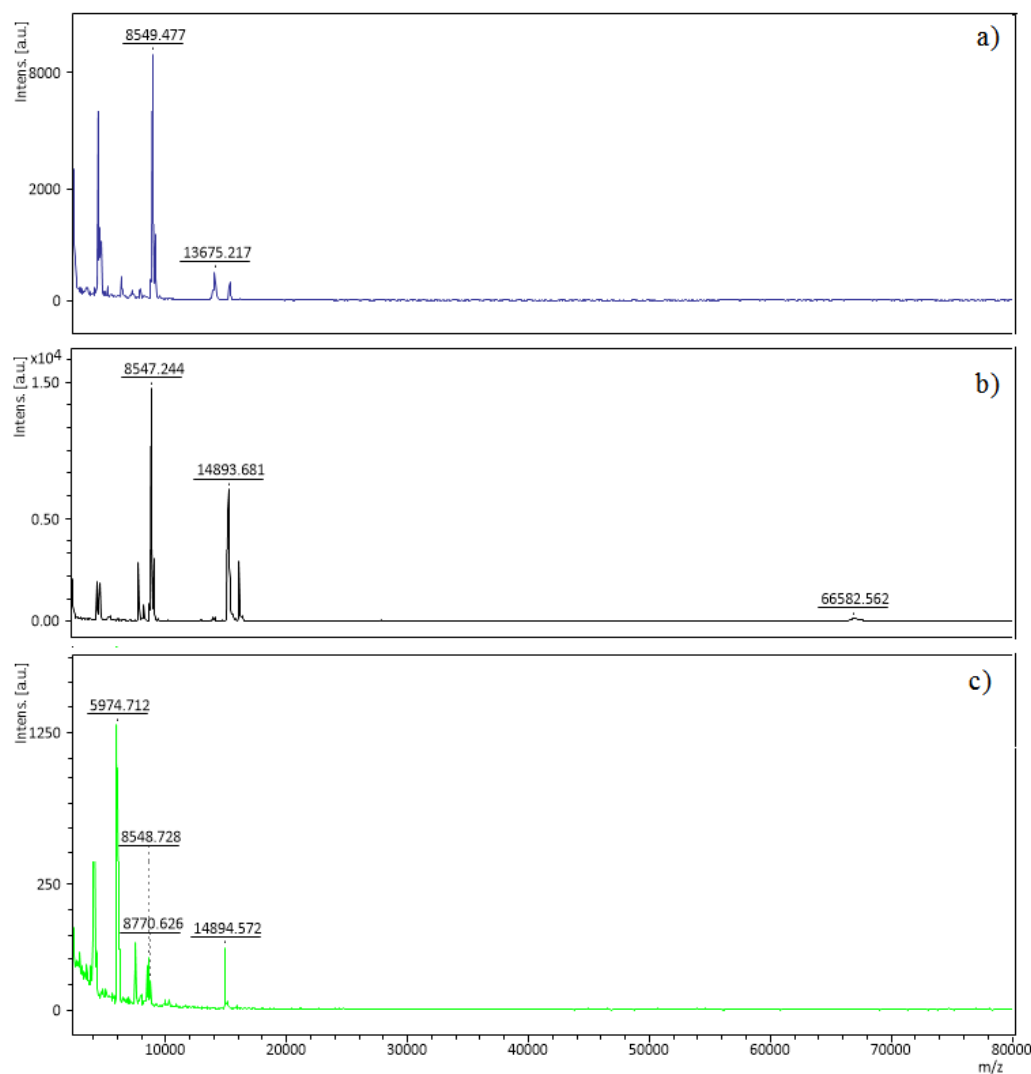


Figure 6-5: MALDI TOF-SIMS spectra of proteins adsorbed on (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$, after incubation with cell culture media (DMEM/F12) with 10 % FBS for 24 h at 37°C .

6.4.2 Biocompatibilities of SPIONs

SPION cytotoxicities were analyzed by several techniques: i) two cytotoxicity tests (PrestoBlue and Trypan Blue) and ii) the detection of ROS generation. The results of all these techniques are in agreement: these SPIONs, exposed to A549 human lung epithelial cancer cells in DMEM/F12 medium are not toxic under our experimental conditions.

6.4.2.1 Cell viability

Cell survival was evaluated by Trypan Blue exclusion and the new, simple, rapid, live PrestoBlue assay, to monitor cell viability and cytotoxicity (Boncler et al., 2014). The Trypan Blue exclusion test revealed that, when compared to untreated cells, there was no mortality of cells treated with any of the SPIONs after 24 h, as shown in Figure 6-6A. We note that, in the presence of all the SPIONs, there is a dose-dependent reduction in cell proliferation (Figure 6-6B). However, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ can be considered non-toxic because biomaterials with cell viability greater than 80% are often recognized as biocompatible (Chang, Y. et al., 2011; Mahmoudi, Simchi, Milani, & Stroeve, 2009). Bare SPIONs inhibit the proliferation of A549 cells, probably due to the fact that their surfaces are rich in hydroxyl groups, due to the hydrolysis of surface oxide.

The PrestoBlue data, in Figure 6-7, indicated that all the three SPIONs reduced the viability of A549 cells in a dose-dependent manner, when compared to cells that were not exposed to these SPIONs. In the presence of FBS, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ is more biocompatible, up to the concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, with viability greater than 80%, compared to control cells, while bare Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ presented viabilities greater than 80% at concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and less.

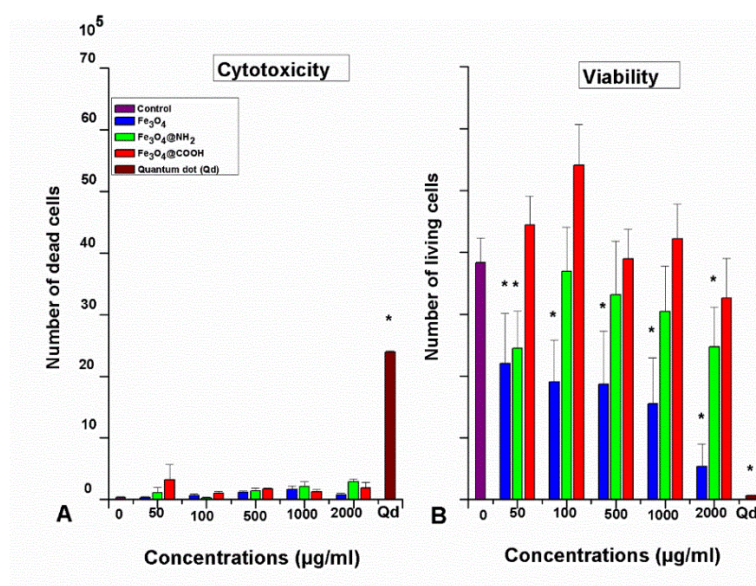


Figure 6-6: Effect of the three SPIONs on the viability of A549 cells (A-Number of living cells; B- Number of dead cells). All incubations were carried out in the presence of serum.

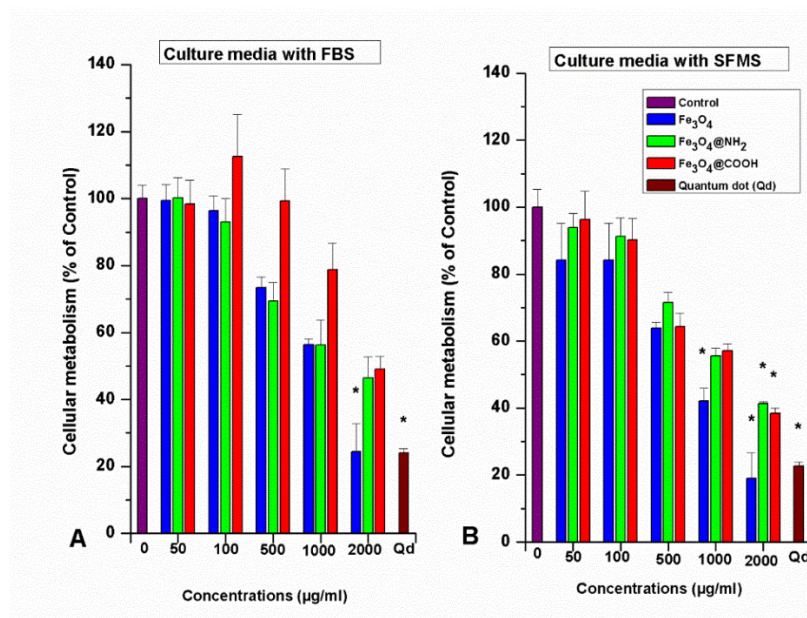


Figure 6-7 : Effect of the three SPIONs, dispersed in DMEM/F12, on cellular metabolism. A- in the presence of fetal bovine serum (FBS); B- in serum-free media supplement (SFMS). A549 cells were treated for 24 h with five concentrations of each dispersion, and the metabolism was measured by PrestoBlue assay

After 24 h of cell incubation, the MTS assays of bare Fe₃O₄ and Fe₃O₄@NH₂ showed dose-dependent reductions of mitochondrial activity (Figure 6-8A and B). One should note that Fe₃O₄@NH₂ is not toxic because the value of the mitochondrial activity is above 80%, compared to the negative control. Bare Fe₃O₄ exhibited toxicity at concentrations above 100 µg/ml, while Fe₃O₄@COOH was not toxic, regardless of concentration. In the presence of proteins, the coated SPIONs show cell proliferations, after 24 hours of incubation, comparable to bare SPIONs.

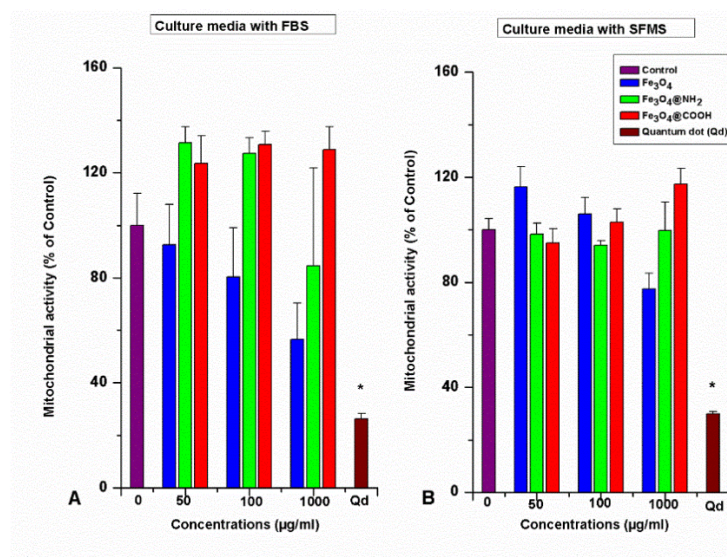


Figure 6-8: Cell viability of A549 cells after culturing with bare and coated SPIONs. The cells were exposed to SPIONs for 24 h and mitochondrial activity was determined by the MTS assay.

6.4.2.2 In situ detection of ROS generation

The possible induction of oxidant activity of these three SPIONs was measured by the fluorogenic probe, DCFH-DA (Wang, H. & Joseph, 1999). On incubation of cells with SPION concentrations of 100, 1000, and 2000 µg/ml for 24 h, none of the three types of SPIONs tested produced significant amounts of ROS. As shown in Figure 6-9, the relative fluorescence, after SPION incubation, was similar to that of untreated control cells. A549 cells were exposed to tBHP (500 µM) for 1 h, as a positive control for the DCFH-DA assay.

Fe₃O₄. The Fe₃O₄@COOH results were similar to those of untreated control cells, at all doses.

For the SPIONs suspended in culture media with FBS (Figure 6-9-B), it is clear that they did not contribute to ROS generation, indicating that the effect of bare SPIONs on oxidative stress is reduced by the presence of a protein corona.

Figure 6-9-A shows the results of the ROS assay, using culture media with synthetic serum. Compared to untreated cells, there is no significant difference in ROS production; however, bare Fe₃O₄ and Fe₃O₄@NH₂ demonstrated slight dose-dependent increases, particularly

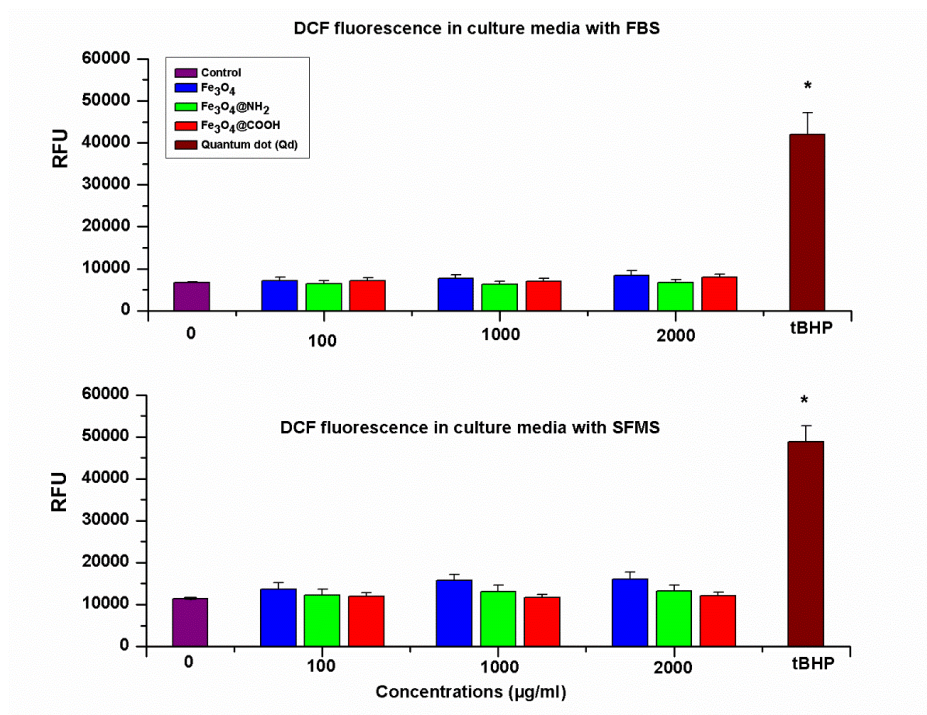


Figure 6-9 : Quantification of oxidative stress in human epithelial cells treated with Fe₃O₄, Fe₃O₄@NH₂ and Fe₃O₄@COOH for 24 h. Cells were incubated with these SPIONs for 24h and DCFH-DA was added before being analysed by fluorescence spectrophotometry at excitation and emission wavelength of 485 and 527 nm, respectively. Untreated cells were used to quantify basal oxidation, while tBHP (500 µM) was used as the positive control. Data are shown as mean ± SD of 4 individual experiments.

6.5 Discussion

Inorganic SPIONs often have high surface energies, facilitating surface oxidation, which leads to particle aggregation and clustering (Zhang, Y., Sun, Kohler, & Zhang, 2004). Our TEM results (Figure 6-1) clearly demonstrate that the three SPIONs used here are well dispersed and present very narrow size distributions. Given the average size of the bare (9.3 nm) and functionalized (10.1 and 10.4 nm) SPIONs, one can estimate that the volume percentage of the coating thicknesses ($\sim 1 \pm 0.2$ nm) is about 10 %. As is found in the literature, the sizes of the SPIONs coated with amine (-NH₂) and carboxylic acid (-COOH) groups are almost the same as those of the bare SPIONs (Hong et al., 2011; Stanicki et al., 2014). As illustrated by Seong *et al.*, these

two coatings do not completely cover the surface of the core (Hong et al., 2011), as our results confirm.

SPIONs have a strong tendency to interact with biomolecules (Xu, M. et al., 2012), such as proteins, in biological environments. These characteristics contribute to variable intracellular responses (Xia, T., Kovochich, Liong, Zink, & Nel, 2008). We included these occasionally overlooked factors into our design, in accordance with recent trends in nanotoxicology publications (Ehrenberg, Friedman, Finkelstein, Oberdorster, & McGrath, 2009; Horie, Nishio, Fujita, Endoh, et al., 2009; Worle-Knirsch, Pulskamp, & Krug, 2006). In water (as expected), and in PBS and culture media with synthetic serum, at high concentration (1000 $\mu\text{g/ml}$), both bare Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ are negatively charged, and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, positively charged, while in cell culture media with FBS (proteins), the three SPIONs are all negatively charged. Therefore, it appears that both the SPION surface chemistry and the environment are determining factors in surface charging. In this case, the medium controlled the surface charge.

Since the presence of serum proteins affects the surface charges of the SPIONs, we examined their levels of protein adsorption. Our results show that they did not adsorb similar amounts of protein from the media. The lowest quantity and number of proteins adsorbed occurred on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$, followed by bare Fe_3O_4 , with $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ having the highest adsorption in both quantity and number. Nel et al. (Nel, A. E. et al., 2009) reported that the proteins that bind most strongly to SPIONs, carbon nanotubes (CNTs), liposomes and polymeric NPs include albumin, immunoglobulins, complement, fibrinogen and apolipoproteins.

We observed some degree of correlation in protein adsorption. The quantity of 4 kDa protein was higher on bare SPIONs (5000 arbitrary units), followed by the quantity adsorbed on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ (1000 au), with the smallest amount on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ (400 au). Functionalization does not provide a self-assembled monolayer, and exposed hydroxyl groups from the bare SPION surface appear to influence the adsorption of the 4 kDa protein.

Carboxylic acid groups, found in large amounts on the surface of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ and in very small quantities on the bare material (Mireles et al., 2014), may influence the adsorption of fibrinogen, accounting for the amounts adsorbed: 1250 and 500 au, respectively. Albumin and monomeric β bHB are adsorbed only in the presence of NH_3^+ (Mireles et al., 2014). Price *et al.* found that fibrinogen adsorption was greater on negative coatings (Price, Cornelius, & Brash,

2001), and Juliano and Lin reported that neutral or positively charged multilamellar coatings bound albumin and apolipoprotein (Patel & Moghimi, 1998). We cannot presently account for the adsorption of apolipoprotein A II.

These results confirm what is found in the literature: the chemical composition of the SPION surface (the functional groups present) and the surface charge affect the characteristics of the corona formed in physiological fluids (Gunawan, Lim, Marquis, & Amal, 2014). Thus, upon the presentation of SPIONs (or other nanoparticles) to cells in physiological fluids, they quickly form biologically active protein coronas, which are, in fact, what the cells encounter.

Several biological entities are known to either promote or retard the recognition of particles by phagocytes *in vivo* (Patel & Moghimi, 1998). Particle clearance by phagocytic cells is markedly enhanced when the surface of the particle to be removed is decorated with critical protein ligands that can interact with appropriate plasma lemma receptors on phagocytes. Such proteins are termed opsonins, indicative of their role in promoting particle recognition by the scavenger cells. In the literature, fibrinogen is considered a non-immune opsonin (Price et al., 2001).

While opsonins promote phagocytosis, primarily by affecting the critical first step of attachment, in which they form a bridge between the phagocytic substrate and phagocyte, they are not generally regarded as being those factors which influence subsequent events in the process, such as internalization and/or digestion of phagocytic substrates. In many cases, the cooperation of a number of opsonic molecules may influence particle recognition by phagocytes. In our study, the adsorption of fibrinogen on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ reduced SPION toxicity. This had already been demonstrated in the literature: *in vitro* studies revealed a lower cytotoxicity of the methotrexate conjugate with fibrinogen, as compared to methotrexate alone, on the A549 cell line (Boratynski, Opolski, Wietrzyk, Gorski, & Radzikowski, 2000), and Torres and his collaborators showed that fibrinogen adsorption promotes the formation of larger and more multinucleated osteoclasts (Torres, Santos, Oliveira, & Barbosa, 2013). In contrast to opsonins, a number of naturally occurring substrates are known to inhibit phagocytic ingestion (Patel, 1992). Generally, these dysopsonins act either by altering the surface properties of the particle or phagocyte (or both), thereby interfering with or thwarting opsonization, or by altering the metabolic activity of the phagocyte, Albumin has dysopsonin-like activity (Ogawara et al., 2004). In light of the

influence of the coating on the adsorption of a specific protein (opsonins or dysopsonins), we can regulate the rate of NP clearance by phagocytes for an optimum drug delivery to a specific tissue.

In vitro studies have shown that the corona formed by albumin reduces the toxicity of NPs (Peng, Q. et al., 2013). In our study, despite the fact that the amount of albumin adsorbed on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$ is small, this was sufficient to reduce its toxicity. The adsorption of opsonins by $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$, and of dysopsonins by $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, reduced the toxicities of these two SPIONs, compared to bare SPIONs, which did not adsorb either fibrinogen or albumin, and which has the highest toxicity at concentrations greater than 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. These surprising results indicate that, in terms of cytotoxicity, adsorbed opsonins and dysopsonins do not play opposite roles *in vitro*, as is the case *in vivo*. It was shown, in the same study, that, while the presence of fibrinogen revealed a lower cytotoxicity of the fibrinogen-MTX conjugate *in vitro*, the same fibrinogen-MTX conjugate showed a significantly increased lethal toxicity, *in vivo* (Boratynski et al., 2000).

The presence of the protein corona affects cellular responses toward the SPIONs in a complex manner. Our results show that the viability and proliferation of the A549 cell line, exposed to the three types of SPIONs, were dependent on two factors: i) the type of coating, and ii) the SPION concentration. It is important to note that the two highest SPION concentrations used in this study (1 and 2 mg/ml) were much higher than concentrations generally used in the literature (10-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Mahmoudi, Hofmann, Rothen-Rutishauser, & Petri-Fink, 2012; Naqvi et al., 2010; Ruan et al., 2011). Based on *in vitro* cytotoxicity assays, we conclude that coated SPIONs can be used in bio-applications over a broad range of concentrations, while bare SPIONs, whose surfaces are rich in hydroxyl groups, can be used at concentration below 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Clearly, the presence of hydroxyl groups influences their potential for toxicity.

Our observations are in agreement with other recent cytotoxicity studies on SPIONs. Several reports demonstrated that SPIONs with various physicochemical characteristics showed no cytotoxicity when used in a concentration range below 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Ankamwar et al., 2010; Karlsson, Cronholm, Gustafsson, & Moller, 2008). Other studies indicate that SPIONs having core-shell structures caused a significant reduction in cell mortality (20% of control), at the lowest concentration studied (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and induced further reductions at higher concentrations, reaching a plateau around 0.5 mg/ml (Gupta, A. K. & Gupta, 2005b).

These results are difficult to compare with other SPIONs, due to differences in experimental methods (Ito et al., 2007; Soenen, S. J., Himmelreich, Nuytten, & De Cuyper, 2011). However, Hussain *et al.* showed that exposure to uncoated SPIONs did not produce cytotoxicity up to the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$, although a significant effect was seen at 250 $\mu\text{g/ml}$ (Hussain et al., 2005). Berry *et al.* also analyzed (bromodeoxyuridine incorporation) the cell proliferation of A549 exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ of dextran-derivatized (DD), albumin derivatized (AD) and underivatized bare SPIONs, and found that the cell proliferation was dependent on SPION surface modification (Berry, Wells, Charles, & Curtis, 2003). Similarly, Gupta *et al.* have shown that bare SPIONs reduced cell adhesion/viability significantly, compared to those that were pullulan-coated (Pn-SPIONs), and cells that were not exposed to the SPIONs. The low toxicity of Pn-SPIONs was attributed to the fact that pullulan is hydrophilic and may protects surfaces from interacting with cells or proteins (Gupta, A. K. & Gupta, 2005a). In contrast, Jeng and Swanson showed that bare SPIONs did not induce cells to lose their viability (Jeng & Swanson, 2006). However, it is important to emphasize that the first step in developing functionalized SPIONs is to understand the biological behavior of bare SPIONs, since, once inside cells, they can be processed by intracellular pathways (e. g., endocytosis pathway) and separated from the conjugated molecules, leading to secondary effects on metabolism or cell functions. Although oxidative effects have been reported in human cells incubated with SPIONs (Bae et al., 2011; Klein, S., Sommer, Distel, Neuhuber, & Krysch, 2012), we did not observe any increase in intracellular ROS, compare to the control, indicating that the toxicity induced at the highest dose (2 mg/ml) is probably caused by another mechanism.

6.6 Conclusions

A thorough study on biocompatibility of SPIONs coated with TPED and TEPSA has been carried out, confirming the influence of the surface charge and the influence of the molecular surface composition on the hard corona composition and, thereby, the cellular response. With the materials and cell line used in this work, the negatively charged TEPSA SPION is more biocompatible than both the positively charged TPED and the bare SPIONs, demonstrating that the impact of functionalization on cell response. None of the nanoparticles induced the production of reactive oxygen species. This study underlines the necessity to consider non-toxic doses of SPIONs, the type of functionalization, and its effect in inducing the adsorption of

proteins useful for biomedical purposes (opsonins or dysopsonins), when optimizing the efficiency of a nanovector in attacking the target cells. It is also clear that maximum doses must be determined of each SPION used.

6.7 References

1. Yang, H.; Zhuang, Y.; Sun, Y.; Dai, A.; Shi, X.; Wu, D.; Li, F.; Hu, H.; Yang, S., Targeted dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging of tumors using multifunctional gadolinium-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2011, 32 (20), 4584-93.
2. Xu, H. H.; Smith, D. T.; Simon, C. G., Strong and bioactive composites containing nano-silica-fused whiskers for bone repair. *Biomaterials* 2004, 25 (19), 4615-26.
3. Gupta, A. K.; Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005, 26 (18), 3995-4021.
4. Zhao, D. L.; Zeng, X. W.; Xia, Q. S.; Tang, J. T., Preparation and coercivity and saturation magnetization dependence of inductive heating property of Fe₃O₄ nanoparticles in an alternating current magnetic field for localized hyperthermia. *J Alloy Compd* 2009, 469 (1-2), 215-218.
5. Ling, Y.; Wei, K.; Luo, Y.; Gao, X.; Zhong, S. Z., Dual docetaxel/superparamagnetic iron oxide loaded nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials* 2011, 32 (29), 7139-7150.
6. Schoepf, U.; Marecos, E. M.; Melder, R. J.; Jain, R. K.; Weissleder, R., Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. *Biotechniques* 1998, 24 (4), 642-6, 648-51.
7. Subbiahdoss, G.; Sharifi, S.; Grijpma, D. W.; Laurent, S.; van der Mei, H. C.; Mahmoudi, M.; Busscher, H. J., Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci. *Acta Biomater* 2012, 8 (6), 2047-55.

8. Lin, Y.; Chen, H.; Lin, K.; Chen, B.; Chiou, C., Application of magnetic particles modified with amino groups to adsorb copper ions in aqueous solution. *J Environ Sci (China)* 2011, 23 (1), 44-50.
9. Stanicki, D.; Boutry, S.; Laurent, S.; Wacheul, L.; Nicolas, E.; Crombez, D.; Elst, L. V.; Lafontaine, D. L. J.; Muller, R. N., Carboxy-silane coated iron oxide nanoparticles: a convenient platform for cellular and small animal imaging. *J Mater Chem B* 2014, 2 (4), 387-397.
10. Kim, J. E.; Shin, J. Y.; Cho, M. H., Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch Toxicol* 2012, 86 (5), 685-700.
11. Dusinska, M.; Fjellsbo, L.; Magdolenova, Z.; Rinna, A.; Runden Pran, E.; Bartonova, A.; Heimstad, E.; Harju, M.; Tran, L.; Ross, B.; Juillerat, L.; Halamoda Kenzaui, B.; Marano, F.; Boland, S.; Guadagnini, R.; Saunders, M.; Cartwright, L.; Carreira, S.; Whelan, M.; Kelin, C.; Worth, A.; Palosaari, T.; Burello, E.; Housiadas, C.; Pilou, M.; Volkovova, K.; Tulinska, J.; Kazimirova, A.; Barancokova, M.; Sebekova, K.; Hurbankova, M.; Kovacikova, Z.; Knudsen, L.; Poulsen, M.; Mose, T.; Vila, M.; Gombau, L.; Fernandez, B.; Castell, J.; Marcomini, A.; Pojana, G.; Bilanicova, D.; Vallotto, D., Testing strategies for the safety of nanoparticles used in medical applications. *Nanomedicine* 2009, 4 (6), 605-7.
12. Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C., The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2012, 14, 1-16.
13. Grudzinski, I. P.; Bystrzejewski, M.; Cywinska, M. A.; Kosmider, A.; Poplawska, M.; Cieszanowski, A.; Fijalek, Z.; Ostrowska, A.; Parzonko, A., Assessing carbon-encapsulated iron nanoparticles cytotoxicity in Lewis lung carcinoma cells. *J Appl Toxicol* 2014, 34 (4), 380-94.
14. Mahmoudi, M.; Lynch, I.; Ejtehadi, M. R.; Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Laurent, S., Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev* 2011, 111 (9), 5610-37.
15. Rahman, M.; Laurent, S.; Tawil, N.; Yahia, L.; Mahmoudi, M., Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface. 2013; Vol. 15.
16. Solina, A.; Papp, D.; Ginsberg, S.; Krause, T.; Grubb, W.; Scholz, P.; Pena, L. L.; Cody, R., A comparison of inhaled nitric oxide and milrinone for the treatment of pulmonary hypertension in adult cardiac surgery patients. *J Cardiothor Vasc An* 2000, 14 (1), 12-17.

17. Seabra, A. B.; Pankotai, E.; Feher, M.; Somlai, A.; Kiss, L.; Biro, L.; Szabo, C.; Kollai, M.; de Oliveira, M. G.; Lacza, Z., S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Dermatol* 2007, 156 (5), 814-8.
18. Zhang, X. F.; Mansouri, S.; Mbeh, D. A.; Yahia, L.; Sacher, E.; Veres, T., Nitric oxide delivery by core/shell superparamagnetic nanoparticle vehicles with enhanced biocompatibility. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2012, 28 (35), 12879-85.
19. Forge, D.; Roch, A.; Laurent, S.; Tellez, H.; Gossuin, Y.; Renaux, F.; Vander Elst, L.; Muller, R. N., Optimization of the Synthesis of Superparamagnetic Contrast Agents by the Design of Experiments Method. *J Phys Chem C* 2008, 112 (49), 19178-19185.
20. Barick, K. C.; Aslam, M.; Prasad, P. V.; Dravid, V. P.; Bahadur, D., Nanoscale assembly of amine functionalized colloidal iron oxide. *J Magn Magn Mater* 2009, 321 (10), 1529-1532.
21. Pareek, N.; Gillgren, T.; Jonsson, L. J., Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. *Bioresour Technol* 2013, 148, 70-7.
22. Mbeh, D. A.; Javanbakht, T.; Tabet, L.; Merhi, Y.; Maghni, K.; Sacher, E.; Yahia, L. H., Protein corona formation on magnetite nanoparticles: effects of culture medium composition, and its consequences on superparamagnetic nanoparticle cytotoxicity. *J Biomed Nanotechnol* 2014.
23. Martin-Piedra, M. A.; Garzon, I.; Oliveira, A. C.; Alfonso-Rodriguez, C. A.; Carriel, V.; Scionti, G.; Alaminos, M., Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy* 2014, 16 (2), 266-77.
24. Boncler, M.; Rozalski, M.; Krajewska, U.; Podsedek, A.; Watala, C., Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2014, 69 (1), 9-16.
25. Nguyen, K. C.; Seligy, V. L.; Tayabali, A. F., Cadmium telluride quantum dot nanoparticle cytotoxicity and effects on model immune responses to *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotoxicology* 2013, 7 (2), 202-11.
26. Doak, S. H.; Griffiths, S. M.; Manshian, B.; Singh, N.; Williams, P. M.; Brown, A. P.; Jenkins, G. J., Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* 2009, 24 (4), 285-93.

27. Elbekai, R. H.; El-Kadi, A. O., The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As³⁺, Cd²⁺, and Cr⁶⁺. *Free Radic Biol Med* 2005, 39 (11), 1499-511.
28. Liu, J. F.; Zhao, Z. S.; Jiang, G. B., Coating Fe₃O₄ magnetic nanoparticles with humic acid for high efficient removal of heavy metals in water. *Environ Sci Technol* 2008, 42 (18), 6949-54.
29. Rosenholm, J. M.; Linden, M., Towards establishing structure-activity relationships for mesoporous silica in drug delivery applications. *J Control Release* 2008, 128 (2), 157-64.
30. Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Milani, A. S.; Stroeve, P., Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 2009, 336 (2), 510-8.
31. Wang, H.; Joseph, J. A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999, 27 (5-6), 612-6.
32. Zhang, Y.; Sun, C.; Kohler, N.; Zhang, M., Self-assembled coatings on individual monodisperse magnetite nanoparticles for efficient intracellular uptake. *Biomed Microdevices* 2004, 6 (1), 33-40.
33. Hong, S. C.; Lee, J. H.; Lee, J.; Kim, H. Y.; Park, J. Y.; Cho, J.; Lee, J.; Han, D. W., Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *Int J Nanomedicine* 2011, 6, 3219-3231.
34. Xu, M.; Li, J.; Iwai, H.; Mei, Q.; Fujita, D.; Su, H.; Chen, H.; Hanagata, N., Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interactions. *Sci Rep* 2012, 2, 406.
35. Xia, T.; Kovochich, M.; Liong, M.; Zink, J. I.; Nel, A. E., Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS Nano* 2008, 2 (1), 85-96.
36. Horie, M.; Nishio, K.; Fujita, K.; Endoh, S.; Miyauchi, A.; Saito, Y.; Iwahashi, H.; Yamamoto, K.; Murayama, H.; Nakano, H.; Nanashima, N.; Niki, E.; Yoshida, Y., Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chem Res Toxicol* 2009, 22 (3), 543-53.

37. Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 2009, 8 (7), 543-57.
38. Price, M. E.; Cornelius, R. M.; Brash, J. L., Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1512 (2), 191-205.
39. Patel, H. M.; Moghimi, S. M., Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system - The concept of tissue specificity. *Adv Drug Deliv Rev* 1998, 32 (1-2), 45-60.
40. Gunawan, C.; Lim, M.; Marquis, C. P.; Amal, R., Nanoparticle-protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticles. *J Mater Chem B* 2014, 2 (15), 2060-2083.
41. Boratynski, J.; Opolski, A.; Wietrzyk, J.; Gorski, A.; Radzikowski, C., Cytotoxic and antitumor effect of fibrinogen-methotrexate conjugate. *Cancer Lett* 2000, 148 (2), 189-195.
42. Torres, A. L.; Santos, S. G.; Oliveira, M. I.; Barbosa, M. A., Fibrinogen promotes resorption of chitosan by human osteoclasts. *Acta Biomater* 2013, 9 (5), 6553-62.
43. Patel, H. M., Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1992, 9 (1), 39-90.
44. Ogawara, K.; Furumoto, K.; Nagayama, S.; Minato, K.; Higaki, K.; Kai, T.; Kimura, T., Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles. *J Control Release* 2004, 100 (3), 451-5.
45. Peng, Q.; Zhang, S.; Yang, Q.; Zhang, T.; Wei, X. Q.; Jiang, L.; Zhang, C. L.; Chen, Q. M.; Zhang, Z. R.; Lin, Y. F., Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system. *Biomaterials* 2013, 34 (33), 8521-30.
46. Mahmoudi, M.; Hofmann, H.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A., Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem Rev* 2012, 112 (4), 2323-38.

47. Ankamwar, B.; Lai, T. C.; Huang, J. H.; Liu, R. S.; Hsiao, M.; Chen, C. H.; Hwu, Y. K., Biocompatibility of Fe(3)O(4) nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. *Nanotechnology* 2010, 21 (7), 75102.
48. Soenen, S. J.; Himmelreich, U.; Nuytten, N.; De Cuyper, M., Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials* 2011, 32 (1), 195-205.
49. Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J., In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 2005, 19 (7), 975-83.
50. Berry, C. C.; Wells, S.; Charles, S.; Curtis, A. S., Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2003, 24 (25), 4551-7.
51. Gupta, A. K.; Gupta, M., Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 2005, 26 (13), 1565-73.
52. Klein, S.; Sommer, A.; Distel, L. V.; Neuhuber, W.; Kryschi, C., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 425 (2), 393-7.
53. Bae, J. E.; Huh, M. I.; Ryu, B. K.; Do, J. Y.; Jin, S. U.; Moon, M. J.; Jung, J. C.; Chang, Y.; Kim, E.; Chi, S. G.; Lee, G. H.; Chae, K. S., The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 2011, 32 (35), 9401-14.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

7.1 Le choix du modèle cellulaire

L'étude *in vitro* de l'interaction des nanoparticules avec l'épithélium alvéolaire nécessite la mise au point de méthodologies fiables, prédictives et reproductibles, adaptées aux nanoparticules. Les conditions expérimentales définies ainsi que le modèle cellulaire choisi, doivent pouvoir être prédictifs d'une exposition réelle chez l'homme. Bien qu'intéressante, l'utilisation de cultures primaires d'épithéliums respiratoires pose des problèmes de reproductibilité et de stabilité. Par ailleurs, la paroi alvéolaire est composée de plusieurs types cellulaires aux caractéristiques spécifiques et aux proportions variables. Il est donc important de choisir la lignée cellulaire la plus proche possible des cellules primaires et suffisamment représentative des types cellulaires rencontrés dans les alvéoles. Plusieurs lignées cellulaires d'épithélium respiratoire humain ont été développées (Sakagami, 2006). Parmi celles-ci, nous avons choisi la lignée cellulaire A549, une lignée cellulaire d'épithélium alvéolaire humain. Elles ont été isolées, immortalisées et caractérisées par l'équipe du Dr Giard (Giard et al., 1973). Elle a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC, 2009). *In vitro*, les cellules A549 se développent sous forme de cellules monocouches adhérentes. La lignée cellulaire A549 est largement utilisée comme modèle *in vitro* des pneumocytes de type II pour le métabolisme des médicaments. Les pneumocytes II représentent 60 % des cellules du revêtement alvéolaire mais occupent seulement 7 % de la surface alvéolaire.

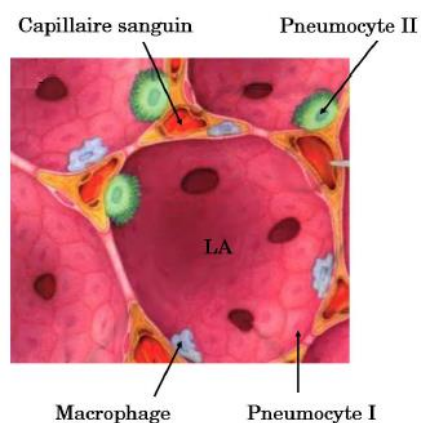


Figure 7-1: Localisation et observation microscopique des pneumocytes II : Organisation cellulaire des alvéoles (SIMON-DECKERS, 2008).

Les cellules sont maintenues et cultivées dans du milieu DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture / F-12) additionné de 10 % (Vol/Vol) de sérum de bovin fœtal, de 2 mM de L-glutamine, de 50 UI.mL⁻¹ de pénicilline et 50 µg.mL⁻¹ de streptomycine. Elles sont incubées dans une étuve à 37 °C en atmosphère humide contrôlée à 5 % de CO₂. Des repiquages sont réalisés à l'aide d'une solution de trypsine 0,05% EDTA, deux fois par semaine lorsqu'elles atteignent 80 % de confluence.

7.2 Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer fonctionnalisées comme vecteurs de molécules dans les voies respiratoires

L'évaluation du potentiel d'une nanoparticule comme vecteur, revient à étudier son interaction avec les cellules de l'organisme, sa capacité à délivrer une molécule d'intérêt, et sa potentielle toxicité sur l'organisme. Cela revient donc à comprendre les mécanismes d'interaction des nanoparticules avec l'environnement biologique. Ces mécanismes dépendent du type d'environnement biologique (cellule, sang, muqueuses, etc.) et des propriétés physico-chimiques de chaque nanoparticule. En effet une nanoparticule est définie par un ensemble de caractéristiques physico-chimiques (taille, forme, propriétés de surface, charge, composition, etc.), chacune susceptible d'influencer significativement ses mécanismes d'interaction avec l'environnement. De plus, comprendre l'influence de ces caractéristiques sur le comportement des nanovecteurs permettrait de concevoir des vecteurs de plus en plus performants, adaptés aux spécificités de chaque type d'application (ciblage, type d'application, mode d'administration...). Des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer sont bien caractérisées et ont été utilisées avec succès comme vecteurs dans de nombreuses applications: cancer (Kayal & Ramanujan, 2010), arthrite (Butoescu et al., 2009). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'interaction moléculaire et cellulaire restent mal compris. L'intérêt de ce travail est donc de comprendre ces mécanismes et l'importance des caractéristiques physico-chimiques dans ceux-ci.

7.3 Preuve du concept du nanovecteur à base de SPIONs

Les résultats que nous avons obtenus et publiés en 2012 d'un essai *in vitro* de la livraison du monoxyde d'azote (NO) aux cellules A549 grâce aux SPIONs, fournissent la preuve de notre concept du développement d'une nouvelle génération de nanovecteur à base de SPIONs. Brièvement, nous avons synthétisé des nanoparticules de SPIONs revêtues d'une première couche de silice et d'une deuxième couche comportant un groupement thiol -SH que nous pouvons dénoter (Fe₃O₄@silice(-SH)). Ces nanoparticules agissent comme de grands réservoirs de stockage du NO. Comme l'illustre la preuve de concept à l'annexe B.

L'ajout des groupes NO, en transformant les groupes SH en -SNO, se produit par la réaction des groupes fonctionnels -SH avec le nitrite de t-butyle. La Figure sur la courbe de libération du NO en l'annexe B montre que le NO peut être délivré avec une sortie durable jusqu'à 50 h.

Ces nanoparticules permettent une amélioration de la biocompatibilité avec le NO libéré tout en permettant l'accumulation intracellulaire attribuée à leur petite taille (voir annexe B).

Nous avons pu démontrer que les SPIONs fonctionnalisées peuvent être utilisées comme nanovecteurs. Ces nanostructures hybrides, avec des noyaux superparamagnétiques, ont un grand potentiel d'application dans le ciblage par champ magnétique, l'imagerie par résonance magnétique, et l'hyperthermie.

7.4 L'évaluation de la biocompatibilité

La biocompatibilité, une notion relative, n'est pas une grandeur mesurable, tout au plus peut-on prétendre apprécier la biocompatibilité d'un matériau à travers la comparaison de son comportement, dans des circonstances expérimentales, à celui de matériaux dits de référence. L'évaluation de tout matériau, matériel ou dispositif destiné à être utilisé chez l'Homme, exige un programme d'évaluation structuré. Dans la stratégie globale d'évaluation de la biocompatibilité, il faut tenir compte non seulement des caractéristiques et des propriétés (physiques, chimiques, mécaniques et morphologiques) des matériaux, mais aussi de la tolérance de ces matériaux. Ces propriétés sont appréhendées au cours de l'évaluation biologique *in vitro*. L'évaluation de la réaction biologique doit suivre des procédures normées décrivant la préparation des échantillons, la technique d'analyse, l'évaluation ainsi que les éléments d'analyse pertinents à relever. La norme européenne EN 30993 (1994) présentée sous le titre général, "Evaluation biologique des

dispositifs médicaux” est remplacée par la norme internationale ISO 10993 (AFNOR, 1994; ASTM, 1991). Elle comprend 20 parties référencées NF EN ISO 10993-1 à NF EN ISO 10993-20. Pour démontrer l’absence de toxicité d’un matériau, la cellule peut être considérée comme la plus petite unité fonctionnelle susceptible d’en percevoir le potentiel toxique éventuel (Harmand et al., 1991). Différents modes d’évaluation, dont le choix est laissé à l’expérimentateur, doivent être utilisés pour rechercher ou comparer d’éventuels effets délétères des matériaux ou de leurs extraits sur ces cultures cellulaires (Nacey, Horsfall, Delahunt, & Marshall, 1986; Talja, Andersson, Ruutu, & Alfthan, 1985). Il est important de garder à l’esprit que l’évaluation de la biocompatibilité d’un biomatériau est complexe et nécessite plus ou moins de tests en fonction de la nature du matériau, du site futur d’implantation et de la durée d’implantation (NF EN ISO 10993-1). Malheureusement, toutes les méthodes d’évaluation de la biocompatibilité ont été conçues pour les biomatériaux à l’échelle micro- ou macroscopique.

L’évaluation de la biocompatibilité des NPs nécessite une adaptation des méthodes de cytotoxicité existantes ou le développement de nouveaux systèmes d’évaluation. Les NPs présentent plusieurs propriétés physico-chimiques uniques telles que les propriétés optiques, l’activité catalytique, l’acidité / l’alcalinité, les propriétés magnétiques, la grande capacité d’adsorption, qui peuvent créer des interactions imprévisibles avec les composants d’essais de toxicité conduisant à une fausse conclusion sur leur toxicité potentielle. Un nombre croissant d’études de toxicité de nanoparticules ont généré des données confuses voir même contradictoires, et les preuves démontrent que les NPs peuvent interférer avec les composants des essais ou des systèmes de détection. En fonction de leur taille et de l’agent de dispersion, les NPs vont soit diffuser ou soit sédimenter dans des cellules exposées. De nombreuses études ont déjà rapporté l’effet de plusieurs paramètres physico-chimiques comme la taille ou la charge de surface des particules sur leur capacité d’interaction moléculaire et cellulaire. Cependant, devant la grande disparité des résultats publiés qui sont souvent contradictoires, force est de constater qu’il est difficile d’établir des modèles permettant de prédire les propriétés biologiques des NPs. Ceci est certainement dû au fait que non seulement il existe encore des paramètres physico-chimiques non étudiés, jouant un rôle majeur dans l’interaction NP-cellule mais également que tous les paramètres agissent de manière synergique. Dans le but de combler ce vide scientifique, les travaux de cette thèse sont dédiés à l’étude de l’effet de la modification des propriétés de

surface des NPs sur leur potentiel toxique une fois exposées aux milieux physiologiques et aux cellules.

Une approche classique de la vectorisation, grâce aux NPs magnétiques, consisterait à fonctionnaliser la NP dans le but de cumuler deux fonctions. Le noyau composé de la magnétite permettra de diriger le nanovecteur par un champ magnétique et d'augmenter sa température une fois à destination. Le revêtement, quant à lui, permettra de greffer le médicament ou la molécule de manière plus stable pour contrôler la quantité et la durée de la livraison.

Cette approche ne garantit aucunement que le nanovecteur restera biocompatible une fois inhalé par le patient et atteindra la cible.

Le choix des revêtements a été orienté par différents facteurs. Premièrement l'avantage d'avoir une surface enrichie en silice, connues comme biocompatible et métabolisable par l'organisme, et la présence des groupements silanol qui peuvent facilement réagir avec des groupements alcools et des agents de couplage à base de silane. La présence du SiO_2 , non seulement produit des dispersions qui sont stables dans des solvants non aqueux, mais permet également l'ancrage idéal pour des liaisons covalentes des ligands spécifiques (Gupta, A. K. & Gupta, 2005a; Mulvaney, Liz-Marzan, Giersig, & Ung, 2000). Deuxièmement, sa synthèse implique peu d'étapes et est relativement simple. En bref, la magnétite@acide oléique ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$) a été produite par la méthode bien connue de la décomposition du $\text{Fe}(\text{CO})_5$ dans l'octyl éther-acide oléique, et précipité dans l'éthanol. Lorsqu'il est ajouté au tétraéthoxysilane (TEOS), alcalin, l'acide oléique est remplacé par une couche de SiO_2 , pour donner la magnétite@silice ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$). Une exposition supplémentaire à l'ortho-ester silane, N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyltriméthoxysilane (AEAP3), a donné lieu à la formation d'une deuxième enveloppe, pour donner la magnétite@silice@silane ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$) (Franca et al., 2013b). Il ne fait aucun doute que les noyaux de ces NPs sont des nanocristaux de magnétite.

Notre approche a consisté à évaluer la biocompatibilité du nanovecteur à chaque étape de sa fonctionnalisation. L'évolution de la taille du nanovecteur a été analysée par la microscopie électronique à transmission (TEM) et la composition moléculaire réelle de chaque nanoparticule a été évaluée et quantifiée par la spectrométrie photoélectronique X (XPS). Pour la première étude, nos résultats ont confirmé les quatre revêtements à savoir : $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ et $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$.

Ceci prouve en partie que la fonctionnalisation permet bien d'augmenter la biocompatibilité des SPIONs. Nos résultats peuvent être comparés avec d'autres études utilisant des NPs comme des nanovecteurs. Il existe différents types de NPs d'oxyde métallique utilisé pour la livraison des molécules thérapeutiques. Plusieurs types de nanoparticules d'oxyde de métal ont montré des effets toxiques sur la morphologie cellulaire, la fonction mitochondriale, la lyse membranaire (par le lactate déshydrogénase (LDH)), la perméabilité de la membrane plasmique et l'apoptose après leur exposition aux cellules. Des particules d'oxyde de zinc se sont révélées être les plus puissantes. Hussain et al. (Hussain et al., 2005) ont montré des effets toxiques sur la morphologie cellulaire, la fonction mitochondriale (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT)), une fuite de la lactate déshydrogénase, le niveaux du glutathion réduit (GSH), les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le potentiel de la membrane mitochondriale (MMP) après exposition des NPs d'Ag aux cellules de foie de rat. Les NPs de Fe_3O_4 et TiO_2 , cependant, se sont révélées être beaucoup moins toxiques (Hussain et al., 2005). Il a été observé que la viabilité des cellules exposées au SPIONs fonctionnalisés est plus élevée que ceux exposés aux SPIONs non fonctionnalisés. Cela peut être dû à une plus faible affinité aux biomolécules (leur dénaturation également) et la capacité de changer le milieu environnant. En outre, les charges de surface sur les SPIONs fonctionnalisés favorisent moins de sites disponibles pour l'adsorption des biomolécules, en comparaison avec les SPIONs fonctionnalisés.

De plus, ces tests ont montré que la réponse cellulaire dépend également du revêtement. Nous avons montré que le métabolisme cellulaire est plus affecté par les NPs ayant les groupements amines à la surface alors que la production de l'interleukine IL-6 est plus affectée par le revêtement en monocouche. Ceci peut être expliqué par le fait que la distribution du revêtement en monocouche à la surface des NPs n'était pas complète et qu'il existe une interaction avec le noyau de la NP composé du Fe_3O_4 et que l'interaction entre les cellules et les groupements amines est différente de celle entre les cellules et la silice.

Il est maintenant bien connu que la surface des matériaux dans un environnement biologique est couverte par des biomolécules (e.g. des protéines) (Cedervall, Lynch, Lindman, et al., 2007; Lynch, Dawson, & Linse, 2006). Par conséquent, une réponse cellulaire à un matériau dans un milieu de culture cellulaire peut refléter les propriétés des couches de biomolécules adsorbées (Lynch & Dawson, 2008). En outre, il a été reconnu que les couches de biomolécules seraient capables de définir l'identité biologique des NPs (Mahmoudi et al., 2010). Les oxydes de fer sont

souvent chargés négativement dans l'eau en raison de l'adsorption de groupes OH^- sur la surface. Les charges de surface donnent lieu à un champ électrique, ce qui va attirer les ions de charge opposée. La couche de charges de surface et des ions de charge opposée forment la double couche électrique (Butt, Graf, & Kappl, 2003). L'attraction du champ électrique est diminuée pour les NPs fonctionnalisées due à une réduction de la quantité de la charge de surface (Butt et al., 2003). En conséquence, les deux nanoparticules revêtues et non revêtues sont sensibles à l'adsorption des protéines mais à des degrés divers.

Ce phénomène a aussi été observé dans notre étude. Des tests de viabilité cellulaire ont montré que la réponse cellulaire aux différents revêtements était bien due à l'interaction spécifique de type NPs / milieu de culture. Nos résultats montrent que la réponse à la même NP est différente quand cette dernière est suspendue au milieu de culture à court terme (2h) par rapport à la suspension à long terme (24h) avant son exposition aux cellules. Ces résultats montrent clairement que la cellule est en contact avec le complexe NP-biomolécules et non la NP elle-même.

La similitude de nos résultats avec ceux de l'étude publiée par Morteza et al. suggère que l'utilisation d'un revêtement de surface sur les NPs permet d'augmenter significativement leur biocompatibilité (Mahmoudi, Simchi, Imani, Milani, & Stroeve, 2009).

7.5 Effets de la composition du milieu de culture sur le potentiel cytotoxique des nanoparticules superparamagnétiques.

La deuxième partie de notre étude s'est concentrée sur l'effet de la composition des milieux de culture sur la capacité d'adsorption des protéines des SPIONs et leur potentiel toxique. Pour ce faire, nous avons utilisé différents milieux de culture enrichis soit avec le sérum organique (FBS) contenant des protéines ou le sérum synthétique (SFMS) sans protéines. Actuellement, il existe très peu d'équipement spécifique à l'analyse des systèmes nanométriques. Généralement leur analyse consiste à adapter les équipements conçus pour des structures micro- ou macrométriques. Pour ce qui concerne l'analyse du corona i.e. les protéines adsorbées sur les nano-biomatériaux,

deux catégories d'analyse existent. Une catégorie qui analyse le hard et le soft corona et l'autre catégorie qui n'analyse que le hard corona.

Vu que le soft corona est la partie la moins stable de l'absorption des protéines nous avons préféré analyser uniquement le hard corona en utilisant le HRTEM, le MALDI TOF-SIMS, FTIR et l'essai Bradford. La présence du corona a été confirmée par les quatre techniques utilisées.

Nous avons choisi la microscopie électronique à transmission à haute résolution (HRTEM) pour réaliser une analyse morphologique grâce à l'image spatiale en 2D de l'épaisseur des différentes couches du complexe NP-protéines. Le HRTEM couplé à une analyse chimique permet d'accéder à la nature des couches et interfaces ou à la distribution d'un élément dans une couche. Pour cet effet, nous avons choisi le MALDI TOF-SIMS et le FTIR.

Le MALDI-TOF SIMS nous permet non seulement d'identifier les protéines du corona mais également d'avoir la quantité de chaque protéine adsorbée. Cette technique est plus avantageuse que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium ou SDS-PAGE par que nous pouvons faire l'analyse du corona directement sur le SPIONs. Nous n'avons pas besoin de l'étape de digestion des protéines, étape essentiel pour l'électrophorèse, qui pourrait provoquer un deuxième niveau de changement de conformation.

Nous avons choisi la spectroscopie infrarouge pour compléter les résultats du MALDI-TOF. C'est l'une des plus anciennes techniques expérimentales bien établies pour l'analyse de la structure secondaire de polypeptides et de protéines. Elle est pratique, non destructive et nécessite moins de préparation de l'échantillon.

La technique du Bradford nous permet de quantifier les protéines en solution.

Nos résultats ont montré que la formation du corona réduit considérablement l'agglomération des SPIONs en suspension. Ceci est en accord avec des résultats publiés sur la stabilisation des suspensions de nanoparticules aqueuses dans l'albumine de sérum bovin (BSA) et le sérum de veau fœtal (FCS) pour empêcher l'agglomération (Schulze, 2008 ; Richter et al., 2007) et l'utilisation du liquide de lavage broncho-alvéolaire signalé d'être un excellent véhicule dans lequel on peut suspendre des nanoparticules même dans une composition réduite avec seulement les constituants protéiques / phospholipidiques les plus importants (Sager et al., 2007).

En plus, à un stade précoce de l'adsorption, les interactions protéine-NP sont médiées différemment d'un milieu de culture à un autre en raison de leur composition différente. Par exemple, tandis que le milieu de culture DMEM/F12 induit une plus grande adsorption de protéine, le F-12K induit, quant à lui l'adsorption d'une large variété de protéines, ce qui démontre que le milieu de culture influe sur les protéines qui sont adsorbées à court terme. Nos résultats ont montré que le corona formé autour de nos NPs est constitué des immunoglobulines (opsonine, qui favorise l'élimination rapide des particules dans le flux sanguin par le système réticulo-endothélial - RES), des apolipoprotéines et de l'albumine (dysopsonine) adsorbée dans le milieu avec sérum organique avant même le contact avec les cellules. L'identité des protéines du corona régit les interactions NPs/cellules et à leur tour, le futur biologique de ces nanoparticules (Mahmoudi, Rahman, Laurent, Tawil, & Yahia, 2013). L'adsorption en quantité élevée d'une protéine spécifique à la surface des particules peut déclencher des processus biologiques fondamentaux comme l'internalisation, l'activation des voies de signalisation cellulaire. C'est ainsi que le revêtement des NPs avec les protéines opsonines, va stimuler leur phagocytose. L'immunoglobuline (protéine opsonisante) donc l'adsorption est favorisée dans le milieu F-12K dans notre étude, pourrait favoriser l'internalisation de la NP si elle est en plus grande quantité que l'albumine (dysopsonisante). Il faut noter que, dans certains cas, la reconnaissance de nanoparticules par les phagocytes peut être médiée par la coopération de plusieurs opsonines. En outre, les cinétiques d'association et de dissociation nanoparticule-protéine ainsi que l'échange simultané des protéines liées avec des protéines «libres» dans le fluide environnant, peuvent également influencer les interactions avec les surfaces des nanoparticules et des récepteurs biologiques. En utilisant des NPs de silice (SiO_2), Lesniak et al. ont observé comment l'absence et la présence du corona modifie le destin biologique de la même particule (Lesniak et al., 2012). Le terme «destin biologique» fait référence à la localisation subcellulaire de nanoparticules. Les NPs sans corona ont été beaucoup plus internalisées par les cellules humaines et ont plus fortement adhéré à la membrane de la cellule par rapport à celles avec un corona. Les NPs sans corona ont été retrouvées dans les vésicules et les lysosomes, et aussi comme particules libres dans le cytosol et comme agrégats à proximité de la membrane plasmique. Les NPs avec un corona, quant à elles, ont été retrouvées dans des vésicules le long de la voie endolysosomale. Ce même groupe a révélé que l'identité du corona est déterminée par l'environnement dans lequel les NPs se sont retrouvées. Les particules récupérées post-exposition cellulaire ont révélé une composition de

corona très différentes. Pour les NPs exposées aux cellules dans le milieu contenant du sérum (présence du corona), les principaux éléments du corona sont des protéines du sérum des immunoglobulines, des protéines du complément et les apolipoprotéines, tandis que dans le milieu sans sérum, les protéines les plus abondantes sont les protéines cytosoliques, les composants du cytosquelette et les protéines associées à la membrane cellulaire (Lesniak et al., 2012).

Dans la plus part des cas, les protéines peuvent subir des changements de conformation et / ou d'orientation lors de leur liaison aux nanoparticules et ceci peut aussi affecter leurs destins biologiques (Gunawan et al., 2014). Ces changements de conformation sont souvent induites par les propriétés physico-chimiques des nanoparticules (charge de surface, courbure et la forme), tandis que dans d'autres cas, les phénomènes peuvent être dus exclusivement aux caractéristiques intrinsèques des protéines et / ou aux protéines adjacentes dans le corona. Les changements structuraux de protéines ont été observés sur les NPs d'oxyde de cérium biologiquement actives (CeO_2).

Plusieurs recherches ont montré que la cytotoxicité des nanoparticules est induite par la libération d'ions ou l'adsorption des protéines (ayant changé de conformation), ou encore la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Horie, Nishio, Fujita, Kato, et al., 2009). Il a été rapporté que la cytotoxicité des composés de Ni et de Zn est induite par les ions métalliques libérés. Les particules ultrafines de NiO et de ZnO ont libéré les ions Ni^{2+} et Zn^{2+} dans le DMEM/FBS, respectivement. Cependant, les NPs de TiO_2 (dont l'effet cytotoxique a été réduit par un traitement de préadsorption de protéine), n'a pas libération d'ions dans le DMEM/FBS. En outre, puisque le NiO, ayant reçu le même traitement de préadsorption de protéine, a montré une tendance à la réduction de la cytotoxicité, la cytotoxicité des particules de NiO a été attribuée dans non seulement la libération d'ions, mais aussi l'adsorption des protéines. Certaines recherches ont rapporté que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Jeong, Oh, Kim, & Jang, 2011; Petushkov, Intra, Graham, Larsen, & Salem, 2009) ont été impliquées dans la cytotoxicité des particules d'oxyde de métal ultrafines. Selon nos résultats de viabilité cellulaire, nos SPIONs ne possèdent pas de potentiel toxique aux différentes concentrations exposées. Nous n'avons pas relevé une production d'espèces réactives d'oxygène *in vitro* quelque soit la concentration étudiée au moyen de l'essai fluorométrique basée sur l'oxydation intracellulaire de 2,7-dichloro diacétate (H2DCF-DA).

7.6 Effet de la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique sur les réponses des cellules épithéliales alvéolaires

La troisième partie de notre projet a visé l'exploration de la fonctionnalisation des SPIONs sur les réponses cellulaires. Dans la plupart des cas, on distingue trois groupes de nanoparticules superparamagnétique d'oxyde de fer: (i) les SPIONs non modifiées i.e. non revêtues présentant un maximum de souplesse et pouvant ensuite être modifiées, (ii) les SPIONs avec une modification chimique spécifique de surface avec du dextran, PEG, des groupes carboxyles ou amines permettant la fonctionnalisation avec d'autres molécules, et (iii) les SPIONs avec des substances spécifiques ou des groupes de reconnaissance, où les molécules liées sont des produits pharmaceutiques, des anticorps ou d'autres substances médicamenteuses (Dufort, Sancey, & Coll, 2012).

Dans cette partie du projet, nous avons synthétisé des NPs possédant différentes compositions chimiques de surface. La première NP est le SPION sans revêtement, la deuxième a un revêtement composé de groupement amine (NH_2) à la surface et la troisième un revêtement composé de groupement carboxylique (COOH) à la surface.

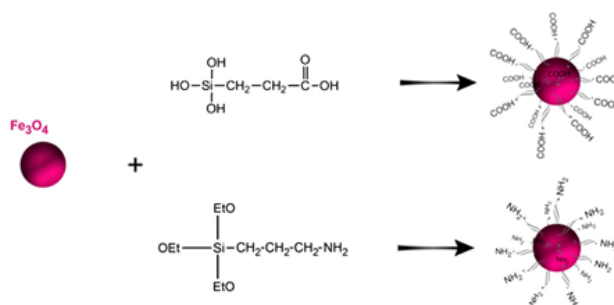


Figure 7-2: Illustration de la composition de surface de nos SPIONs

Dans les applications biologiques, les nanoparticules avec un revêtement ont des avantages majeurs sur les nanoparticules simples, conduisant à l'amélioration des propriétés telles que (i) la réduction de l'agglomération des SPIONs dans un milieu biologique; (ii) l'augmentation de la

dispersion, la cyto-compatibilité biologique; (iii) une meilleure conjugaison avec d'autres molécules bioactives, (iv) une plus grande stabilité thermique et chimique, (iv) la prévention de l'opsonisation de SPIONs; (v) la biocompatibilité des SPIONs et ainsi de suite (Mahmoudi, Sant, et al., 2011; Sounderya & Zhang, 2008).

Nos résultats ont montré une bonne dispersion, une réduction de l'agglomération des SPIONs dans le milieu de culture cellulaire. Différents tests colorimétriques d'évaluation de la viabilité cellulaire ont été vérifiés et utilisés sur des cellules exposées pendant 24h aux nanoparticules.

Nos résultats ont montré que le potentiel toxique de nos NPs dépend de deux principaux facteurs : la concentration de la NP et le type de revêtement de surface. En fait, l'activité mitochondriale, le métabolisme cellulaire et la viabilité cellulaire diminue lorsque la concentration des NPs augmente. Les NPs sans revêtement sont plus toxiques que les nanoparticules fonctionnalisées et les NPs avec les groupements carboxyliques (COOH) sont moins toxiques que les NPs avec les groupements amine (NH₂). Afin d'être utilisées pour des applications biomédicales sécuritaires et haut rendement, nos SPIONs doivent présenter un revêtement continu. Afin de satisfaire à cette exigence, plusieurs revêtements organiques et inorganiques sont proposés dans la littérature. Ces revêtements comprennent le polyéthylène glycol, le polyéthylène glycol fumarate, l'alcool polyvinylique, des revêtements à base de polysaccharides, les polyesters synthétiques, l'alginate, le chitosane etc (Laurent, Dutz, Hafeli, & Mahmoudi, 2011).

7.7 Défis à relever lors des études de la formation du corona et l'exploitation de ce phénomène

La formation du corona, déjà thermodynamiquement et cinétiquement complexe, peut être encore compliquée par d'autres facteurs inadvertants autres que les propriétés physico-chimiques intrinsèques de la particule déjà discutées et les caractéristiques du milieu biologique en suspension. Pour des nanoparticules ayant des propriétés de surface identiques, l'identité des protéines du corona formé peut être différente tout simplement à cause de la variation des échantillons du milieu biologique spécifique utilisé. Un bon exemple est donné par le sérum

sanguin, donc la composition exacte varie d'un individu à un autre et même chez le même individu au cours de la journée, ce qui entraîne des variations dynamiques de la composition et de la structure des protéines adsorbées entre les individus décrites par l'effet vroman (Maiorano et al., 2010; Muthusamy et al., 2005). De plus, même de petites modifications dans les techniques de caractérisation du corona, telles que des étapes de lavage et la vitesse de centrifugation, peuvent entraîner des problèmes de reproductibilité (Hamad-Schifferli, 2013). Pour remédier à ces difficultés, un certain nombre d'efforts de recherche ont été dirigés vers la prédiction de l'adsorption des acides aminés sur des nanoparticules ou en d'autres termes, pour prédire la tendance générale d'adsorption des protéines spécifiques sur les nanoparticules spécifiques. La quantification prédictive des interactions acide-aminé nanoparticules, appelée l'indice d'adsorption de surface biologique (BSAI), décrit les interactions moléculaires entre les groupes chimiques de surface des nanoparticules et les résidus d'acides aminés des protéines (Xia, X. R., Monteiro-Riviere, & Riviere, 2010). Un ensemble de descripteurs moléculaires et nanométriques a été déterminé pour une gamme de molécules et des nanomatériaux, respectivement, avec celle-ci allant de nanotubes de carbone au dioxyde de titane. Les descripteurs moléculaires et nanométriques ont été quantifiés sur la base des cinq forces fondamentales qui régissent les interactions moléculaires dans un environnement biologique: (1) la force de Coulomb (le potentiel zêta des particules chargées), (2) la dispersion de London (hydrophobicité), (3) de liaisons hydrogène acidité et basicité, (4) la polarité / polarisabilité et (5) des paires électrons solitaires (Xia, X. R. et al., 2011; Xia, X. R. et al., 2010) .

Un autre phénomène difficile dans les études du corona est le changement éventuel des propriétés physico-chimiques des nanoparticules, qui doit être pris en compte d'un lot à un autre (Franca et al., 2013b) et lors de l'exécution dans l'extrapolation *in vitro* - *in vivo* du comportement des particules dans l'environnement biologique. Les différentes voies d'exposition des nanoparticules chez les humains peuvent également entraîner des modifications inattendues sur les caractéristiques des particules, et affecter par conséquent le corona formé et leurs destins biologiques (Johnston, Brown, Kermanizadeh, Gubbins, & Stone, 2012).

7.8 Contamination et stérilisation

Les nanomatériaux, en raison de la nature hautement réactive de leur surface, peuvent adsorber de nombreuses molécules du milieu environnant, pour réduire l'énergie libre de surface. Par

conséquent, les contaminants non intentionnels peuvent être introduits sur la surface des nanomatériaux par adsorption de l'air ou des composés de la solution de suspension (Jones & Grainger, 2009). L'endotoxine est parmi les molécules qui peuvent se lier aux nanomatériaux. L'endotoxine est susceptible d'adsorber sur des surfaces hydrophobes grâce à son fragment lipidique, alors que les groupements phosphate permettent de se lier à des surfaces chargées positivement. De ce fait, l'endotoxine est en théorie capable de s'adsorber à tous les types de surfaces (Gorbet & Sefton, 2005; Jones & Grainger, 2009). L'endotoxine ou lipopolysaccharide (LPS) est une molécule de la membrane externe des bactéries Gram-négatives, qui est un élément important dans l'habileté des bactéries à causer des maladies. L'endotoxine est constitué d'une partie polysaccharide et d'une partie lipidique, appelée lipide A, responsable de sa toxicité. L'évaluation de Yang Li sur un certain nombre de nanomatériaux commerciaux a montré que la plupart d'entre eux sont contaminés par l'endotoxine. Son équipe a également montré que des lots différents d'un même nanomatériau synthétisé dans le même laboratoire montrent différents niveaux de contamination d'endotoxine selon la propreté de la procédure de synthèse (Oostingh et al., 2011; Yang, L., 2014). Certaines recherches ont déjà abordé l'effet de l'endotoxine sur les nanoparticules. Une co-administration d'endotoxine par Inoue et al. a favoriser les effets secondaires des nanoparticules manufacturées sur la fonction pulmonaire à la fois *in vitro* et *in vivo* (Inoue et al., 2006). Les effets biologiques des endotoxines peuvent alors masquer ou interférer avec les véritables effets biologiques des nanomatériaux.

L'essai RPT (rabbit pyrogen test) et l'essai LAL (Limulus Amoebocyte Lysate) sont des méthodes de détection d'endotoxines les plus couramment utilisées qui sont approuvées par la FDA et acceptées par presque tous les pays. Toutefois, en raison du coût élevé et à un long délai d'exécution de l'essai RPT (et l'utilisation des animaux), la méthode la plus populaire de détection des endotoxines reste l'essai LAL qui fournit une évaluation rapide, sensible et spécifique.

Il est important d'être conscient que l'endotoxine ne peut pas être éliminée par la stérilisation. Pour l'obtention d'une préparation de nanomatériaux sans endotoxine, toutes les procédures doivent être effectuées avec des réactifs et la verrerie non contaminés. Le moyen le plus efficace de détruire l'endotoxine est l'incinération obtenue par exemple par chauffage à sec à des températures élevées (180 °C pendant 3 h ou 250 °C pendant 30 min) (Vallhov et al., 2006). Cette méthode ne peut pas être utilisée pour le traitement de la plupart des nanomatériaux une fois synthétisés, à cause d'une possible modification des caractéristiques physico-chimiques de

surface. Par conséquent, la meilleure façon d'avoir un taux négligeable d'endotoxine ou les nanomatériaux non contaminés est de prendre des précautions lors des procédés de synthèse.

Les études nanotoxicologiques devraient prendre en considération la présence de contaminants bioactifs indésirables, dont l'endotoxine bactérienne est la plus fréquente et abondante. Cela permettrait d'éviter une mauvaise interprétation des résultats expérimentaux et l'attribution erronée à des nanoparticules des effets toxiques qui peuvent être entièrement attribuables à des contaminants. À cette fin, non seulement les biologistes / toxicologues devraient être conscient du danger et concevoir/exécuter adéquatement leurs expériences, mais les chimistes devraient concevoir des procédés de synthèse de manière à éviter toute contamination.

Il est nécessaire de stériliser les dispositifs médicaux en général après leur fabrication afin de prévenir une contamination bactérienne. Les méthodes conventionnelles de stérilisation utilisent la chaleur, les agents chimiques et les radiations ionisantes. La stérilisation à haute température se présente sous la forme de chaleur humide (autoclave), chaleur sèche (étuve) ou d'incinération. Les agents chimiques de stérilisation pour les biomatériaux sont le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le formaldéhyde CH_2O , l'acide peracétique, et l'oxyde d'éthylène $(\text{CH}_2)_2\text{O}$. Parmi eux, l'oxyde d'éthylène est le plus utilisé. Les radiations ionisantes sont les rayons γ , les électrons, le rayon UV. La stérilisation à la chaleur est effectuée à des températures élevées et peut entraîner une dégradation des biomatériaux en général et des nanomatériaux fonctionnalisés en particulier. La stérilisation à l'oxyde d'éthylène nécessite une quarantaine et produit des résidus toxiques. Il existe actuellement des alternatives comme la stérilisation au plasma ou à l'ozone. Cependant, aucun des procédés de stérilisation n'est idéal, i.e. sans dégradations structurelles, en ce qui concerne les nanomatériaux. Certains chercheurs ont suggéré qu'un traitement antibiotique pourrait être un procédé pratique et efficace pour stériliser les biomatériaux ou alors l'utilisation d'un filtre dans le cas des nanomatériaux.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ce projet rapporte l'étude des mécanismes d'interaction des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, avec les cellules épithéliales alvéolaires, et permet d'en comprendre les implications sur leur potentiel comme système de délivrance de molécules dans les voies respiratoires. Pour ce faire, nous avons exploré la biocompatibilité, le phénomène d'adsorption des protéines et l'effet de la fonctionnalisation. Les études de biocompatibilité ont montré que ces nanoparticules ne sont pas toxiques à faible concentration sur les cellules A549, dans nos conditions expérimentales. Cependant, à forte concentration, les NPs sans revêtement sont plus toxiques que celles avec un revêtement. De plus, le revêtement avec un groupement amine, ayant une charge de surface positive, est plus toxique que celui avec un revêtement carboxylique, ayant une charge de surface négative. Ces études montrent par ailleurs l'importance des conditions expérimentales et notamment le choix du milieu de culture, la présence de sérum dans le milieu de culture lors de l'étude de la toxicité des nanoparticules. Par ailleurs, elles soulignent l'importance de mieux adapter les tests de toxicité traditionnels à l'étude de la biocompatibilité, en prenant en compte des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules.

De nombreuses questions restent encore non résolues sur les mécanismes de toxicité des NPs. Il est important de savoir si les NPs réduisent le métabolisme, la prolifération et la viabilité cellulaire à cause de la production des ions, ou l'adsorption des protéines ou encore la production des ROS. Dans notre cas, nos NPs ne produisent pas les ROS dans les milieux de culture utilisées. Nous convenons plus à l'influence de l'adsorption des protéines sur le potentiel toxique de nos NPs puisque l'analyse des ions par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) n'a pas donné des quantités détectables.

L'effet de l'adsorption des protéines sur les NPs a été étudié en comparant trois milieux de culture cellulaire enrichis avec soit un sérum organique soit un sérum synthétique. Nous avons observé que la formation du corona présentait en même temps des avantages tels que la réduction de l'agglomération des NPs, l'augmentation de la dispersion des NPs dans les différents milieux, ce qui pourrait réduire le potentiel toxique *in vitro et in vivo*, la prévention de l'opsonisation de SPIONs quand les protéines qui inhibent la phagocytoses sont adsorbées et les désavantages

lorsque les protéines opsonines s'adsorbent, ce qui pourrait conduire à l'élimination rapide des particules dans le flux sanguin par le système du réticulum endothélial. L'identité et la quantité des protéines adsorbées dépendent de la composition de la surface et de la composition du milieu physiologique. Une connaissance approfondie de la formation du corona et de leurs effets sur les interactions de nanoparticules et du système biologique devrait être intégrée comme facteur pour ajuster les propriétés physico-chimiques telles que la composition chimique, la taille, la forme et la surface des nanoparticules pour une liaison préférentielle de groupes de protéines spécifiques. Pour une application clinique, la liaison des groupes «appropriés» de protéines facilitera les réponses biologiques souhaitables à l'égard des nanoparticules, sous formes de récepteur spécifique pour la délivrance ciblée, pour une circulation *in vivo* plus longue, l'activation de la réponse immunitaire, la récupération de biomolécules pathologiques et aussi important, l'atténuation des effets cytotoxiques involontaires de nanoparticules. Bien que beaucoup ait été révélé sur l'existence et les effets biologiques du corona, à ce jour, il y a encore des obstacles à surmonter en ce qui concerne la caractérisation du corona, en raison de la nature complexe et dynamique de la formation de cette dernière. Mis à part les effets entrelacés des propriétés physico-chimiques des nanoparticules ainsi que les caractéristiques de fluide biologique sur la formation de corona, même de légers changements dans les méthodes expérimentales peuvent entraîner des variations importantes de la composition du corona formé, qui à son tour peut conduire à une altération des réponses biologiques. Néanmoins, la découverte du corona et ses effets sur les destins biologiques des nanoparticules donne un avantage considérable à l'ingénierie des nanostructures pour des fonctions biologiques spécifiques.

Enfin, l'effet de la fonctionnalisation des NPs montre que le revêtement réduit le potentiel toxique de ces dernières. La charge de surface influence l'identité des protéines adsorbées et ensuite la réponse cellulaire.

Pour compléter l'étude que nous avons réalisée sur la toxicité des NPs sans et avec revêtement, un revêtement continu permettrait de valider notre approche de formulation des NPs. Pour ce faire, il serait nécessaire avant tout de modifier légèrement la formulation du vecteur pour éviter l'exposition du noyau composé de l'oxyde de fer et son interaction directe avec le milieu physiologique et de ce fait avec les cellules. Pour cela, il est possible d'ajouter une couche de polymère comme le PEG avant de lier les groupements amine ou carboxylique.

Les SPIONs présentent certains avantages quant à leur interaction avec les cellules et leur possibilité de fonctionnalisation. Comme nous l'avons montré, il est possible de leur greffer des molécules thérapeutiques. De plus la formulation de leur revêtement peut être modifiée pour leur conférer certaines propriétés spécifiques (charge) qui leur permettra d'avoir plus d'affinité à certaines protéines ou biomolécules. Ces affinités peuvent se traduire par une optimisation du ciblage cellulaire.

RECOMMANDATIONS

Pour la suite de ce projet, nous avons quelques recommandations :

1. Validation par des essais *in vivo* sur un modèle animal (type nanotoxicité par inhalation) ou dans un modèle *ex-vivo* pour étudier l'effet Vroman.
2. Modélisation, type QNAR, pour prédire l'adsorption des protéines. Il existe notamment un type de modèle appelé QSAR (Quantitative structure-activity relationship) permettant de prédire l'effet ou le comportement d'une molécule d'après sa structure chimique. Fourches et ses collaborateurs (Fourches, Pu, & Tropsha, 2011) ont mise en place un model analogue appliqué aux nanoparticules magnétiques qu'il dénomme QNAR (quantitative nanostructures Activity Relationship) qui pourrait être utile pour la prévision des profils d'activité de nouvelles nanoparticules magnétiques uniquement à partir de descripteurs représentatifs.
3. Mesure des ROS : trouver des méthodes de quantification des principaux ROS.
4. Modélisation des cascades du système immunitaire.

RÉFÉRENCES

- Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: Contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(9-10), 1140-1149. doi: DOI 10.1089/ars.2005.7.1140
- AFNOR, A. f. a. d. n.-. (1994). *Evaluation biologique des dispositifs médicaux. Partie 5, Essais concernant la cytotoxicité : méthodes in vitro*. Paris: Paris : AFNOR, ©1994.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4), 324-329. doi: 10.1016/j.jbspin.2007.02.002
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14 1-16. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, J. P. (2007). *Molecular Biology of the Cell 5th Edition*.
- Allouni, Z. E., Cimpan, M. R., Hol, P. J., Skodvin, T., & Gjerdet, N. R. (2009). Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 68(1), 83-87. doi: DOI 10.1016/j.colsurfb.2008.09.014
- Andrade, J. D., & Hlady, V. (1986). Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses. *Adv Polym Sci* 79 1-63.
- Ankamwar, B., Lai, T. C., Huang, J. H., Liu, R. S., Hsiao, M., Chen, C. H., & Hwu, Y. K. (2010). Biocompatibility of Fe(3)O(4) nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. *Nanotechnology*, 21(7), 75102. doi: 10.1088/0957-4484/21/7/075102
- Arbab, A. S., Jordan, E. K., Wilson, L. B., Yocum, G. T., Lewis, B. K., & Frank, J. A. (2004). In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. *Human Gene Therapy*, 15(4), 351-360. doi: Doi 10.1089/104303404322959506
- Arbab, A. S., Wilson, L. B., Ashari, P., Jordan, E. K., Lewis, B. K., & Frank, J. A. (2005). A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in biomedicine*, 18(6), 383-389. doi: Doi 10.1002/Nbm.970
- Arima, Y., & Iwata, H. (2007). Effects of surface functional groups on protein adsorption and subsequent cell adhesion using self-assembled monolayers. *Journal of Materials Chemistry*, 17(38), 4079-4087. doi: Doi 10.1039/B708099a
- Arvizo, R. R., Miranda, O. R., Thompson, M. A., Pabelick, C. M., Bhattacharya, R., Robertson, J. D., . . . Mukherjee, P. (2010). Effect of Nanoparticle Surface Charge at the Plasma Membrane and Beyond. *Nano Letters*, 10(7), 2543-2548. doi: Doi 10.1021/Nl101140t

- AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*, 3(2), 279-290. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:19236062
- ASTM. (1991). Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices. *Annual Book of ASTM Standards, Medical Devices and Services Section 13*.
- Atanasijevic, T., Shusteff, M., Fam, P., & Jasanoff, A. (2006). Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), 14707-14712. doi: DOI 10.1073/pnas.0606749103
- ATCC. (2009). A549 (ATCC CRM-CCL-185)
- ATCC, A. T. C. C. (2004). Formulation for F-12K Medium Tiré de <http://www.atcc.org/Attachments/4890>; <http://www.atcc.org/Attachments/4894>; <http://www.atcc.org/Attachments/4892>.
- Auffan, M., Bottero, J. Y., Chaneac, C., & Rose, J. (2010). Inorganic manufactured nanoparticles: how their physicochemical properties influence their biological effects in aqueous environments. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 5(6), 999-1007. doi: 10.2217/nmm.10.61
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., . . . Bottero, J. Y. (2006). In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environmental science & technology*, 40(14), 4367-4373. doi: Doi 10.1021/Es060691k
- Bae, J. E., Huh, M. I., Ryu, B. K., Do, J. Y., Jin, S. U., Moon, M. J., . . . Chae, K. S. (2011). The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 32(35), 9401-9414. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.075
- Barbucci, R., Magnani, A., Chiumiento, A., Pasqui, D., Cangiolli, I., & Lamponi, S. (2005). Fibroblast cell behavior on bound and adsorbed fibronectin onto hyaluronan and sulfated hyaluronan substrates. *Biomacromolecules*, 6(2), 638-645. doi: Doi 10.1021/Bm049642v
- Barick, K. C., Aslam, M., Prasad, P. V., Dravid, V. P., & Bahadur, D. (2009). Nanoscale assembly of amine functionalized colloidal iron oxide. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 321(10), 1529-1532. doi: 10.1016/j.jmmm.2009.02.080
- Barth, A., & Zscherp, C. (2002). What vibrations tell us about proteins. *Quarterly reviews of biophysics*, 35(4), 369-430. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12621861>
- Beasley, A. M., Auffarth, G. U., & von Recum, A. F. (1996). Intraocular lens implants: a biocompatibility review. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 9(6), 399-413. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8981213>
- Berry, C. C., Wells, S., Charles, S., & Curtis, A. S. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25), 4551-4557. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950997>

- Blanco, E. M., Horton, M. A., & Mesquida, P. (2008). Simultaneous investigation of the influence of topography and charge on protein adsorption using artificial nanopatterns. *Langmuir*, 24(6), 2284-2287. doi: Doi 10.1021/La702957f
- Boncler, M., Rozalski, M., Krajewska, U., Podsedek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 69(1), 9-16. doi: 10.1016/j.vascn.2013.09.003
- Bonnefont-Rousselot, D. (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5(5), 561-568. doi: Doi 10.1097/00075197-200209000-00016
- Boratynski, J., Opolski, A., Wietrzyk, J., Gorski, A., & Radzikowski, C. (2000). Cytotoxic and antitumor effect of fibrinogen-methotrexate conjugate. *Cancer Letters*, 148(2), 189-195. doi: Doi 10.1016/S0304-3835(99)00334-1
- Bossé Y, Joannis DR, & MR., B. (2003). Modulations rédox de la contraction musculaire. *Science et motricité*, 50 7-31.
- Boyd, A. R., Burke, G. A., Duffy, H., Holmberg, M., Kane, C. O., Meenan, B. J., & Kingshott, P. (2011). Sputter deposited bioceramic coatings: surface characterisation and initial protein adsorption studies using surface-MALDI-MS. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 22(1), 71-84. doi: DOI 10.1007/s10856-010-4180-8
- Buford, M. C., Hamilton, R. F., Jr., & Holian, A. (2007). A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 4 6. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:17655771
- Bulte, J. W. M. (2009). In Vivo MRI Cell Tracking: Clinical Studies. *American Journal of Roentgenology*, 193(2), 314-325. doi: Doi 10.2214/Ajr.09.3107
- Butoescu, N., Jordan, O., Burdet, P., Stadelmann, P., Petri-Fink, A., Hofmann, H., & Doelker, E. (2009). Dexamethasone-containing biodegradable superparamagnetic microparticles for intra-articular administration: Physicochemical and magnetic properties, in vitro and in vivo drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(3), 529-538. doi: DOI 10.1016/j.ejpb.2009.03.003
- Butt, H. J., Graf, K., & Kappl, M. (2003). *Physics and Chemistry of Interfaces*. Weinheim.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-71. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:20419892
- Calero, M., Gutierrez, L., Salas, G., Luengo, Y., Lazaro, A., Acedo, P., . . . Villanueva, A. (2014). Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 10(4), 733-743. doi: DOI 10.1016/j.nano.2013.11.010
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., Braydich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(43), 13608-13619. doi: Doi 10.1021/Jp712087m

- Casals, E., & Puentes, V. F. (2012). Inorganic nanoparticle biomolecular corona: formation, evolution and biological impact. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 7(12), 1917-1930. doi: 10.2217/nnm.12.169
- Cavalu, S., & Simon, V. (2007). Proteins adsorption to orthopaedic biomaterials: vibrational spectroscopy evidence. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 9(11), 3297-3302. Tiré de <Go to ISI>://000251435200001
- Cedervall, T., Lynch, I., Foy, M., Berggard, T., Donnelly, S. C., Cagney, G., . . . Dawson, K. A. (2007). Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition*, 46(30), 5754-5756. doi: DOI 10.1002/anie.200700465
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., . . . Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2050-2055. doi: 10.1073/pnas.0608582104
- Cengelli, F., Maysinger, D., Tschudi-Monnet, F., Montet, X., Corot, C., Petri-Fink, A., . . . Juillerat-Jeanneret, L. (2006). Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318(1), 108-116. doi: 10.1124/jpet.106.101915
- Cha, P., Krishnan, A., Fiore, V. F., & Vogler, E. A. (2008). Interfacial energetics of protein adsorption from aqueous buffer to surfaces with varying hydrophilicity. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(6), 2553-2563. doi: 10.1021/la703310k
- Chairuangkitti, P., Lawanprasert, S., Roytrakul, S., Aueviriyavit, S., Phummiratch, D., Kulthong, K., . . . Maniratanachote, R. (2013). Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27(1), 330-338. doi: 10.1016/j.tiv.2012.08.021
- Champion, J. A., & Mitragotri, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 4930-4934. doi: DOI 10.1073/pnas.0600997103
- Chang, S. Y., Zheng, N. Y., Chen, C. S., Chen, C. D., Chen, Y. Y., & Wang, C. R. C. (2007). Analysis of peptides and proteins affinity-bound to iron oxide nanoparticles by MALDI MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(5), 910-918. doi: DOI 10.1016/j.jasms.2007.01.011
- Chang, Y., Yang, S. T., Liu, J. H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., . . . Wang, H. (2011). In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology letters*, 200(3), 201-210. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.11.016
- Chatterjee, J., Haik, Y., & Chen, C. J. (2003). Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 257(1), 113-118. doi: Pii S0304-8853(02)01066-1
- Doi 10.1016/S0304-8853(02)01066-1

- Chen, D. Y., Jiang, M. J., Li, N. J., Gu, H. W., Xu, Q. F., Ge, J. F., . . . Lu, J. M. (2010). Modification of magnetic silica/iron oxide nanocomposites with fluorescent polymethacrylic acid for cancer targeting and drug delivery. *Journal of Materials Chemistry*, 20(31), 6422-6429. doi: Doi 10.1039/C0jm00320d
- Chen, E., Ruvalcaba, M., Araujo, L., Chapman, R., & Chin, W. C. (2008). Ultrafine titanium dioxide nanoparticles induce cell death in human bronchial epithelial cells. *Journal of Experimental Nanoscience*, 3(3), 171-183. doi: Doi 10.1080/17458080802412430
- Chen, Z. P., Xu, R. Z., Zhang, Y., & Gu, N. (2009). Effects of Proteins from Culture Medium on Surface Property of Silanes- Functionalized Magnetic Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 4(3), 204-209. doi: DOI 10.1007/s11671-008-9226-1
- Choi, S. J., & Choy, J. H. (2011). Effect of physico-chemical parameters on the toxicity of inorganic nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 21(15), 5547-5554. doi: Doi 10.1039/C1jm10167f
- Christopher, R. A., Judge, S. R., Vincent, P. A., Higgins, P. J., & McKeown-Longo, P. J. (1999). The amino-terminal matrix assembly domain of fibronectin stabilizes cell shape and prevents cell cycle progression. *Journal of cell science*, 112 (Pt 19) 3225-3235. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:10504328
- Colvin, V. L. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature biotechnology*, 21(10), 1166-1170. doi: 10.1038/nbt875
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37-44. doi: Doi 10.1038/Nature01451
- Conroy, J., Byrne, S. J., Gun'ko, Y. K., Rakovich, Y. P., Donegan, J. F., Davies, A., . . . Volkov, Y. (2008). CdTe Nanoparticles Display Tropism to Core Histones and Histone-Rich Cell Organelles. *Small*, 4(11), 2006-2015. doi: DOI 10.1002/smll.200800088
- Decuzzi, P., & Ferrari, M. (2008). The receptor-mediated endocytosis of nonspherical particles. *Biophysical Journal*, 94(10), 3790-3797. doi: DOI 10.1529/biophysj.107.120238
- Deng, Z. J., Liang, M. T., Toth, I., Monteiro, M., & Minchin, R. F. (2013). Plasma protein binding of positively and negatively charged polymer-coated gold nanoparticles elicits different biological responses. *Nanotoxicology*, 7(3), 314-322. doi: Doi 10.3109/17435390.2012.655342
- Deng, Z. J., Mortimer, G., Schiller, T., Musumeci, A., Martin, D., & Minchin, R. F. (2009). Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, 20(45). doi: Artn 455101
- Doi 10.1088/0957-4484/20/45/455101
- DiPietro, R. S., Johnson, H. G., Bennett, S. P., Nummy, T. J., Lewis, L. H., & Heiman, D. (2010). Determining magnetic nanoparticle size distributions from thermomagnetic measurements. *Applied Physics Letters*, 96(22). doi: Artn 222506
- Doi 10.1063/1.3441411
- Doak, S. H., Griffiths, S. M., Manshian, B., Singh, N., Williams, P. M., Brown, A. P., & Jenkins, G. J. (2009). Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis*, 24(4), 285-293. doi: 10.1093/mutage/geb010

- Dobrovolskaia, M. A., & Mcneil, S. E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature nanotechnology*, 2(8), 469-478. doi: DOI 10.1038/nnano.2007.223
- Doshi, N., & Mitragotri, S. (2010). Needle-shaped polymeric particles induce transient disruption of cell membranes. *Journal of the Royal Society Interface*, 7 S403-S410. doi: DOI 10.1098/rsif.2010.0134.focus
- Dousset, V., Delalande, C., Ballarino, L., Quesson, B., Seilhan, D., Coussemacq, M., . . . Caille, J. M. (1999). In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 41(2), 329-333. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080281>
- Dufort, S., Sancey, L., & Coll, J. L. (2012). Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Advanced drug delivery reviews*, 64(2), 179-189. doi: DOI 10.1016/j.addr.2011.09.009
- Dujardin, E., & Mann, S. (2002). Bio-inspired materials chemistry. *Advanced Engineering Materials*, 4(7), 461-474. doi: Doi 10.1002/1527-2648(20020717)4:7<461::Aid-Adem461>3.0.Co;2-K
- Dukhin, A. S., & Goetz, P. J. (1996). Acoustic and electroacoustic spectroscopy. *Langmuir*, 12(18), 4336-4344. doi: Doi 10.1021/La951086q
- Dusinska, M., Fjellsbo, L., Magdolenova, Z., Rinna, A., Runden Pran, E., Bartonova, A., . . . Vallotto, D. (2009). Testing strategies for the safety of nanoparticles used in medical applications. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 4(6), 605-607. doi: 10.2217/nnm.09.47
- Ehrenberg, M. S., Friedman, A. E., Finkelstein, J. N., Oberdorster, G., & McGrath, J. L. (2009). The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials*, 30(4), 603-610. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.050
- Elbekai, R. H., & El-Kadi, A. O. (2005). The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As³⁺, Cd²⁺, and Cr⁶⁺. *Free radical biology & medicine*, 39(11), 1499-1511. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.012
- Fertsch-Gapp, S., Semmler-Behnke, M., Wenk, A., & Kreyling, W. G. (2011). Binding of polystyrene and carbon black nanoparticles to blood serum proteins. *Inhalation Toxicology*, 23(8), 468-475. doi: Doi 10.3109/08958378.2011.583944
- Feynman, R. P. (1959, february 1960). [There's Plenty of Room at the Bottom: <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>].
- Fiorito, S., Serafino, A., Andreola, F., & Bernier, P. (2006). Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon*, 44(6), 1100-1105. doi: DOI 10.1016/j.carbon.2005.11.009
- Forge, D., Roch, A., Laurent, S., Tellez, H., Gossuin, Y., Renaux, F., . . . Muller, R. N. (2008). Optimization of the Synthesis of Superparamagnetic Contrast Agents by the Design of Experiments Method. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(49), 19178-19185. doi: Doi 10.1021/Jp803832k

- Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D., & Timbrell, J. A. (2005). Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 19(4), 481-489. doi: 10.1016/j.tiv.2005.02.001
- Fourches, D., Pu, D. Q. Y., & Tropsha, A. (2011). Exploring Quantitative Nanostructure-Activity Relationships (QNAR) Modeling as a Tool for Predicting Biological Effects of Manufactured Nanoparticles. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14(3), 217-225. doi: Doi 10.2174/138620711794728743
- Franca, R., Zhang, X. F., Veres, T., Yahia, L., & Sacher, E. (2013a). Core-shell nanoparticles as prodrugs: possible cytotoxicological and biomedical impacts of batch-to-batch inconsistencies. *J Colloid Interface Sci*, 389(1), 292-297. doi: 10.1016/j.jcis.2012.08.065
- Franca, R., Zhang, X. F., Veres, T., Yahia, L., & Sacher, E. (2013b). Core-shell nanoparticles as prodrugs: possible cytotoxicological and biomedical impacts of batch-to-batch inconsistencies. *Journal of colloid and interface science*, 389(1), 292-297. doi: 10.1016/j.jcis.2012.08.065
- Fukuda, Y., Ando, K., Ishikura, R., Kotoura, N., Tsuda, N., Kato, N., . . . Nakao, N. (2006). Superparamagnetic iron oxide (SPIO) MRI contrast agent for bone marrow imaging: differentiating bone metastasis and osteomyelitis. *Magnetic resonance in medical sciences : MRMS : an official journal of Japan Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 5(4), 191-196. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332709>
- Ganim, Z., Chung, H. S., Smith, A. W., Deflores, L. P., Jones, K. C., & Tokmakoff, A. (2008). Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of proteins. *Accounts of chemical research*, 41(3), 432-441. doi: 10.1021/ar700188n
- Ge, Y., Zhang, Y., Xia, J., Ma, M., He, S., Nie, F., & Gu, N. (2009). Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake in vitro. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 73(2), 294-301. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.031
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., . . . Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental health perspectives*, 113(11), 1555-1560. doi: Doi 10.1289/Ehp.8006
- Geys, J., Nemery, B., & Hoet, P. H. (2010). Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 24(2), 620-629. doi: 10.1016/j.tiv.2009.10.007
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417-1423. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357758>
- Goffin, A. L., Duquesne, E., Raquez, J. M., Miltner, H. E., Ke, X. X., Alexandre, M., . . . Dubois, P. (2010). From polyester grafting onto POSS nanocage by ring-opening polymerization

- to high performance polyester/POSS nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry*, 20(42), 9415-9422. doi: Doi 10.1039/C0jm00283f
- Goldsmith, H. L., & Turitto, V. T. (1986). Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, 55(3), 415-435. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3750272>
- Gorbet, M. B., & Sefton, M. V. (2005). Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials*, 26(34), 6811-6817. doi: DOI 10.1016/j.biomaterials.2005.04.063
- Griesser, H. J., Kingshott, P., McArthur, S. L., McLean, K. M., Kinsel, G. R., & Timmons, R. B. (2004). Surface-MALDI mass spectrometry in biomaterials research. *Biomaterials*, 25(20), 4861-4875. doi: DOI 10.1016/j.biomaterials.2004.01.049
- Grudzinski, I. P., Bystrzejewski, M., Cywinska, M. A., Kosmider, A., Poplawska, M., Cieszanowski, A., . . . Parzonko, A. (2014). Assessing carbon-encapsulated iron nanoparticles cytotoxicity in Lewis lung carcinoma cells. *Journal of applied toxicology : JAT*, 34(4), 380-394. doi: 10.1002/jat.2947
- Gunawan, C., Lim, M., Marquis, C. P., & Amal, R. (2014). Nanoparticle-protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(15), 2060-2083. doi: Doi 10.1039/C3tb21526a
- Gupta, A. K., & Curtis, A. S. G. (2004). Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials*, 25(15), 3029-3040. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:14967536
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005a). Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 26(13), 1565-1573. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.05.022
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005b). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012
- Gupta, A. K., Naregalkar, R. R., Vaidya, V. D., & Gupta, M. (2007). Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2(1), 23-39. doi: Doi 10.2217/17435889.2.1.23
- Gupta, A. K., & Wells, S. (2004). Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *Ieee Transactions on Nanobioscience*, 3(1), 66-73. doi: Doi 10.1109/Tnb.2003.820277
- Gutin, P. H. (2002). The potential value of iron oxide nanoparticles in brain tumor treatment. *American Journal of Neuroradiology*, 23(4), 505-505. Tiré de <Go to ISI>://000175512200001
- Hagiwara, T., Sakiyama, T., & Watanabe, H. (2009). Molecular Simulation of Bovine beta-Lactoglobulin Adsorbed onto a Positively Charged Solid Surface. *Langmuir*, 25(1), 226-234. doi: Doi 10.1021/La8024149

- Hamad-Schifferli, K. (2013). How can we exploit the protein corona? *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 8(1), 1-3. doi: Doi 10.2217/Nnm.12.179
- Harmand, M. F., Bordenave, L., Bareille, R., Naji, A., Jeandot, R., Rouais, F., & Ducassou, D. (1991). In vitro evaluation of an epoxy resin's cytocompatibility using cell lines and human differentiated cells. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2(1), 67-79. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1863579>
- Herrmann, K. A., Zech, C. J., Michaely, H. J., Seiderer, J., Ochsenkuehn, T., Reiser, M. F., & Schoenberg, S. O. (2005). Comprehensive magnetic resonance imaging of the small and large bowel using intraluminal dual contrast technique with iron oxide solution and water in magnetic resonance enteroclysis. *Investigative Radiology*, 40(9), 621-629. doi: DOI 10.1097/01.rli.0000175037.15022.85
- Holt, B. D., Short, P. A., Rape, A. D., Wang, Y. L., Islam, M. F., & Dahl, K. N. (2010). Carbon Nanotubes Reorganize Actin Structures in Cells and ex Vivo. *ACS nano*, 4(8), 4872-4878. doi: Doi 10.1021/Nn101151x
- Hong, S. C., Lee, J. H., Lee, J., Kim, H. Y., Park, J. Y., Cho, J., . . . Han, D. W. (2011). Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International journal of nanomedicine*, 6 3219-3231. doi: Doi 10.2147/Ijn.S26355
- Hoopes, P., Strawbridge, R., Gibson, U., Zeng, Q., Pierce, Z., Savellano, M., . . . Foreman, A. (2007). Intratumoral Iron Oxide Nanoparticle Hyperthermia and Radiation Cancer Treatment. *Proceedings - Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers*, 6440 64400K. doi: 10.1117/12.706302
- Horie, M., Nishio, K., Fujita, K., Endoh, S., Miyauchi, A., Saito, Y., . . . Yoshida, Y. (2009). Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chemical research in toxicology*, 22(3), 543-553. doi: 10.1021/tx800289z
- Horie, M., Nishio, K., Fujita, K., Kato, H., Nakamura, A., Kinugasa, S., . . . Nakanishi, J. (2009). Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release. *Chemical research in toxicology*, 22(8), 1415-1426. doi: 10.1021/tx900171n
- Hoskins, C., Wang, L., Cheng, W. P., & Cuschieri, A. (2012). Dilemmas in the reliable estimation of the in-vitro cell viability in magnetic nanoparticle engineering: which tests and what protocols? *Nanoscale Res Lett*, 7 77. doi: 10.1186/1556-276X-7-77
- Hu, F. Q., Wei, L., Zhou, Z., Ran, Y. L., Li, Z., & Gao, M. Y. (2006). Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for in vivo magnetic resonance detection of cancer. *Advanced materials*, 18(19), 2553-+. doi: DOI 10.1002/adma.200600385
- Hulander, M., Hong, J., Andersson, M., Gerven, F., Ohrlander, M., Tengvall, P., & Elwing, H. (2009). Blood Interactions with Noble Metals: Coagulation and Immune Complement Activation. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 1(5), 1053-1062. doi: Doi 10.1021/Am900028e
- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., & Schlager, J. J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro : an international*

journal published in association with BIBRA, 19(7), 975-983. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.034

- Ilbert, M., Graf, P. C. F., & Jakob, U. (2006). Zinc center as redox switch - New function for an old motif. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5-6), 835-846. doi: DOI 10.1089/ars.2006.8.835
- Inoue, K. I., Takano, H., Yanagisawa, R., Hirano, S., Sakurai, M., Shimada, A., & Yoshikawa, T. (2006). Effects of airway exposure to nanoparticles on lung inflammation induced by bacterial endotoxin in mice. *Environmental health perspectives*, 114(9), 1325-1330. doi: Doi 10.1289/Ehp.8903
- Ishii, N. (2007). Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer. *Cornea*, 26(9 Suppl 1), S3-9. doi: 10.1097/ICO.0b013e31812f6745
- Ito, A., Fujioka, M., Yoshida, T., Wakamatsu, K., Ito, S., Yamashita, T., . . . Honda, H. (2007). 4-S-Cysteaminyphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma. *Cancer science*, 98(3), 424-430. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00382.x
- Jeng, H. A., & Swanson, J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 41(12), 2699-2711. doi: 10.1080/10934520600966177
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3 S26-36; discussion S36-28. doi: 10.1002/ana.10483
- Jeong, Y. S., Oh, W. K., Kim, S., & Jang, J. (2011). Cellular uptake, cytotoxicity, and ROS generation with silica/conducting polymer core/shell nanospheres. *Biomaterials*, 32(29), 7217-7225. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.020
- Jiang, X., Weise, S., Hafner, M., Rocker, C., Zhang, F., Parak, W. J., & Nienhaus, G. U. (2010). Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 7 Suppl 1 S5-S13. doi: 10.1098/rsif.2009.0272.focus
- Jo, Y. S., van der Vlies, A. J., Gantz, J., Thacher, T. N., Antonijevic, S., Cavadini, S., . . . Hubbell, J. A. (2009). Micelles for delivery of nitric oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 131(40), 14413-14418. doi: 10.1021/ja905123t
- Johnson, F., & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*, 26(4-5), 340-352. doi: 10.1016/j.mam.2005.07.006
- Johnston, H., Brown, D., Kermanizadeh, A., Gubbins, E., & Stone, V. (2012). Investigating the relationship between nanomaterial hazard and physicochemical properties: Informing the exploitation of nanomaterials within therapeutic and diagnostic applications. *Journal of Controlled Release*, 164(3), 307-313. doi: DOI 10.1016/j.jconrel.2012.08.018
- Jones, C. F., & Grainger, D. W. (2009). In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6), 438-456. doi: DOI 10.1016/j.addr.2009.03.005
- Kai, W., Xiaojun, X., Ximing, P., Zhenqing, H., & Qiqing, Z. (2011). Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells. *Nanoscale Research Letters*, 6 480. doi: 10.1186/1556-276X-6-480

- Kang, H. W., Josephson, L., Petrovsky, A., Weissleder, R., & Bogdanov, A. (2002). Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture. *Bioconjugate chemistry*, 13(1), 122-127. doi: Doi 10.1021/Bc0155521
- Karatas, O. F., Sezgin, E., Aydin, O., & Culha, M. (2009). Interaction of gold nanoparticles with mitochondria. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 71(2), 315-318. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.02.020
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Moller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical research in toxicology*, 21(9), 1726-1732. doi: 10.1021/tx800064j
- Kayal, S., & Ramanujan, R. V. (2010). Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 30(3), 484-490. doi: DOI 10.1016/j.msec.2010.01.006
- Kenzaoui, B. H., Vila, M. R., Miquel, J. M., Cengelli, F., & Juillerat-Jeanneret, L. (2012). Evaluation of uptake and transport of cationic and anionic ultrasmall iron oxide nanoparticles by human colon cells. *International journal of nanomedicine*, 7 1275-1286. doi: Doi 10.2147/Ijn.S26865
- Kettering, M., Winter, J., Zeisberger, M., Bremer-Streck, S., Oehring, H., Bergemann, C., . . . Hilger, I. (2007). Magnetic nanoparticles as bimodal tools in magnetically induced labelling and magnetic heating of tumour cells: an in vitro study. *Nanotechnology*, 18(17). doi: Artn 175101
- Doi 10.1088/0957-4484/18/17/175101
- Kim, H., Yoon, S. C., Lee, T. Y., & Jeong, D. (2009). Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicology letters*, 184(1), 13-17. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.10.006
- Kim, J., Lee, Y., Singha, K., Kim, H. W., Shin, J. H., Jo, S., . . . Kim, W. J. (2011). NONOates--polyethylenimine hydrogel for controlled nitric oxide release and cell proliferation modulation. *Bioconjugate chemistry*, 22(6), 1031-1038. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:21528906
- Kim, J. E., Shin, J. Y., & Cho, M. H. (2012). Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Archives of toxicology*, 86(5), 685-700. doi: 10.1007/s00204-011-0773-3
- Kim, M. J., Kim, J. H., Chung, J. J., Park, M. S., Lim, L. S., & Oh, Y. T. (2003). Focal hepatic lesions: Detection and characterization with combination gadolinium- and superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging. *Radiology*, 228(3), 719-726. doi: DOI 10.1148/radiol.2283020735
- Kingshott, P., St John, H. A. W., Chatelier, R. C., & Griesser, H. J. (2000). Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry detection of proteins adsorbed in vivo onto contact lenses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49(1), 36-42. doi: Doi 10.1002/(Sici)1097-4636(200001)49:1<36::Aid-Jbm5>3.0.Co;2-B
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., . . . Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and

- effects. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 27(9), 1825-1851. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:19086204
- Klein, J. A., & Ackerman, S. L. (2003). Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 111(6), 785-793. doi: 10.1172/JCI18182
- Klein, S., Sommer, A., Distel, L. V., Neuhuber, W., & Krysch, C. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 425(2), 393-397. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.108
- Kohane, D. S. (2007). Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(2), 203-209. doi: 10.1002/bit.21301
- Kosmulski, M. (2009). pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach. *Journal of colloid and interface science*, 337(2), 439-448. doi: 10.1016/j.jcis.2009.04.072
- Kostura, L., Kraitchman, D. L., Mackay, A. M., Pittenger, M. F., & Bulte, J. W. M. (2004). Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR in biomedicine*, 17(7), 513-517. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:15526348
- Kreyling, W., & Scheuch, G. (2000). *Clearance of particles deposited in the lungs*: Marcel Dekker.
- Krishna, K. S., Li, Y. H., Li, S. N., & Kumar, C. S. S. R. (2013). Lab-on-a-chip synthesis of inorganic nanomaterials and quantum dots for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 65(11-12), 1470-1495. doi: DOI 10.1016/j.addr.2013.05.006
- Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., & Schneckeburger, J. (2009). Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 370-377. doi: DOI 10.1016/j.ejpb.2008.08.009
- Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., & Schneckeburger, J. (2012). Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of toxicology*, 86(7), 1123-1136. doi: 10.1007/s00204-012-0837-z
- Kruis, F. E., Fissan, H., & Peled, A. (1998). Synthesis of nanoparticles in the gas phase for electronic, optical and magnetic applications - A review. *Journal of Aerosol Science*, 29(5-6), 511-535. doi: Doi 10.1016/S0021-8502(97)10032-5
- Kumar, M. N. V. R. (2000). Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 234-258. Tiré de <Go to ISI>://000088676500003
- Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Kroll, A., Hahn, D., Schneckeburger, J., Wiench, K., & Wohlleben, W. (2010). Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Advanced materials*, 22(24), 2601-2627. doi: 10.1002/adma.200902658
- Laurent, S., Dutz, S., Hafeli, U. O., & Mahmoudi, M. (2011). Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*, 166(1-2), 8-23. doi: DOI 10.1016/j.cis.2011.04.003

- Lemine, O. M., Bououdina, M., Sajieddine, M., Al-Saie, A. M., Shafi, M., Khatab, A., . . . Henini, M. (2011). Synthesis, structural, magnetic and optical properties of nanocrystalline ZnFe₂O₄. *Physica B-Condensed Matter*, 406(10), 1989-1994. doi: DOI 10.1016/j.physb.2011.02.072
- Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M. P., Aberg, C., Dawson, K. A., & Salvati, A. (2012). Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS nano*, 6(7), 5845-5857. doi: 10.1021/nn300223w
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4(1), 26-49. doi: DOI 10.1002/sml.200700595
- Li, S. D., & Huang, L. (2008). Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 496-504. doi: Doi 10.1021/Mp800049w
- Lim, J., Eggeman, A., Lanni, F., Tilton, R. D., & Majetich, S. A. (2008). Synthesis and single-particle optical detection of low-polydispersity plasmonic-superparamagnetic nanoparticles. *Advanced materials*, 20(9), 1721-+. doi: DOI 10.1002/adma.200702196
- Lim, J., Lanni, C., Evarts, E. R., Lanni, F., Tilton, R. D., & Majetich, S. A. (2011). Magnetophoresis of Nanoparticles. *ACS nano*, 5(1), 217-226. doi: Doi 10.1021/Nn102383s
- Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*, 8. doi: Artn 381
Doi 10.1186/1556-276x-8-381
- Limbach, L. K., Li, Y. C., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M., . . . Stark, W. J. (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental science & technology*, 39(23), 9370-9376. doi: Doi 10.1021/Es051043o
- Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A., & Stark, W. J. (2007). Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental science & technology*, 41(11), 4158-4163. doi: Doi 10.1021/Es062629t
- Lin, Y., Chen, H., Lin, K., Chen, B., & Chiou, C. (2011). Application of magnetic particles modified with amino groups to adsorb copper ions in aqueous solution. *Journal of environmental sciences*, 23(1), 44-50. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476339>
- Linazasoro, G. (2008). Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy. *Parkinsonism & related disorders*, 14(5), 383-392. doi: 10.1016/j.parkreldis.2007.11.012
- Ling, Y., Wei, K., Luo, Y., Gao, X., & Zhong, S. Z. (2011). Dual docetaxel/superparamagnetic iron oxide loaded nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials*, 32(29), 7139-7150. doi: DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.05.089
- Liu, J. F., Zhao, Z. S., & Jiang, G. B. (2008). Coating Fe₃O₄ magnetic nanoparticles with humic acid for high efficient removal of heavy metals in water. *Environmental science & technology*, 42(18), 6949-6954. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853814>

- Liu, W., Rose, J., Plantevin, S., Auffan, M., Bottero, J. Y., & Vidaud, C. (2013). Protein corona formation for nanomaterials and proteins of a similar size: hard or soft corona? *Nanoscale*, 5(4), 1658-1668. doi: 10.1039/c2nr33611a
- Longmire, M., Choyke, P. L., & Kobayashi, H. (2008). Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 3(5), 703-717. doi: Doi 10.2217/17435889.3.5.703
- Lu, X. Y., Li, D. J., Huang, Y., & Zhang, Y. Y. (2007). Application of a modified Coomassie brilliant blue protein assay in the study of protein adsorption on carbon thin films. *Surface & Coatings Technology*, 201(15), 6843-6846. doi: DOI 10.1016/j.surfcoat.2006.09.019
- Lynch, I., Cedervall, T., Lundqvist, M., Cabaleiro-Lago, C., Linse, S., & Dawson, K. A. (2007). The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Advances in colloid and interface science*, 134-135 167-174. doi: 10.1016/j.cis.2007.04.021
- Lynch, I., & Dawson, K. A. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, 3(1-2), 40-47. doi: Doi 10.1016/S1748-0132(08)70014-8
- Lynch, I., Dawson, K. A., & Linse, S. (2006). Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2006(327), pe14. doi: 10.1126/stke.3272006pe14
- Lynch, I., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2009). Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nature nanotechnology*, 4(9), 546-547. doi: 10.1038/nnano.2009.248
- Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B., & Petri-Fink, A. (2012). Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemical reviews*, 112(4), 2323-2338. doi: 10.1021/cr2002596
- Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M. R., Monopoli, M. P., Bombelli, F. B., & Laurent, S. (2011). Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chemical reviews*, 111(9), 5610-5637. doi: 10.1021/cr100440g
- Mahmoudi, M., Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., & Yahia, L. H. (2013). *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-nano Interface - Springer Series in Biophysics*.
- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., & Sen, T. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 63(1-2), 24-46. doi: 10.1016/j.addr.2010.05.006
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Milani, A. S., & Stroeve, P. (2009). An in vitro study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure. *Nanotechnology*, 20(22), 225104. doi: 10.1088/0957-4484/20/22/225104
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Shokrgozar, M. A., Milani, A. S., Hafeli, U. O., & Stroeve, P. (2010). A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), 300-309. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.08.044

- Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A. S., & Stroeve, P. (2009). Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 336(2), 510-518. doi: 10.1016/j.jcis.2009.04.046
- Maiorano, G., Sabella, S., Sorce, B., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Cingolani, R., & Pompa, P. P. (2010). Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS nano*, 4(12), 7481-7491. doi: 10.1021/nn101557e
- Maiorov, V. N., & Crippen, G. M. (1992). Contact Potential That Recognizes the Correct Folding of Globular-Proteins. *Journal of molecular biology*, 227(3), 876-888. doi: Doi 10.1016/0022-2836(92)90228-C
- Malmsten, M. (1998). Formation of adsorbed protein layers. *Journal of colloid and interface science*, 207(2), 186-199. doi: DOI 10.1006/jcis.1998.5763
- Martin-Piedra, M. A., Garzon, I., Oliveira, A. C., Alfonso-Rodriguez, C. A., Carriel, V., Scionti, G., & Alaminos, M. (2014). Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*, 16(2), 266-277. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.10.016
- Mbeh, D. A., Javanbakht, T., Tabet, L., Merhi, Y., Maghni, K., Sacher, E., & Yahia, L. H. (2014). Protein corona formation on magnetite nanoparticles: effects of culture medium composition, and its consequences on superparamagnetic nanoparticle cytotoxicity. *Journal of Biomedical Nanotechnology*
- Mejias, R., Gutierrez, L., Salas, G., Perez-Yague, S., Zotes, T. M., Lazaro, F. J., . . . Barber, D. F. (2013). Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications. *J Control Release*, 171(2), 225-233. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.07.019
- Meza, M. (1997). *Application of magnetic particles in immunoassays* New York.
- Mickuviene, I., Kirveliėne, V., & Juodka, B. (2004). Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 18(5), 639-648. doi: 10.1016/j.tiv.2004.02.001
- Migliore, L., & Coppede, F. (2002). Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 512(2-3), 135-153. doi: Pii S1383-5742(02)00046-7
- Doi 10.1016/S1383-5742(02)00046-7
- Milani, S., Bombelli, F. B., Pitek, A. S., Dawson, K. A., & Radler, J. (2012). Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *ACS nano*, 6(3), 2532-2541. doi: Doi 10.1021/Nn204951s
- Minotti, G., & Aust, S. D. (1987). The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 262(3), 1098-1104. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3027077>
- Mireles, L. K., Talantikit, M., Stanicki, D., Laurent, S., Mohammadi, M., Sacher, E., & Yahia, L. (2014). *Iron oxide nanoparticles and magnetosomes as nitric oxide delivery vehicles in implants: A physicochemical study of the role of the nanoparticles coating environment.*

- Mnyusiwalla, A., Daar, A. S., & Singer, P. A. (2003). 'Mind the gap': science and ethics in nanotechnology. *Nanotechnology*, 14(3), R9-R13. doi: Pii S0957-4484(03)57090-8
Doi 10.1088/0957-4484/14/3/201
- Monteiro-Riviere, N. A., Inman, A. O., & Zhang, L. W. (2009). Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), 222-235. doi: DOI 10.1016/j.taap.2008.09.030
- Mor, G. K., Shankar, K., Paulose, M., Varghese, O. K., & Grimes, C. A. (2006). Use of highly-ordered TiO₂ nanotube arrays in dye-sensitized solar cells. *Nano Letters*, 6(2), 215-218. doi: 10.1021/nl052099j
- Moret, S. (2002). *Synthèse et modification chimique de la surface des nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales* (Université de Bordeaux I-France, Bordeaux).
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
- Muller, K. H., Motskin, M., Philpott, A. J., Routh, A. F., Shanahan, C. M., Duer, M. J., & Skepper, J. N. (2014). The effect of particle agglomeration on the formation of a surface-connected compartment induced by hydroxyapatite nanoparticles in human monocyte-derived macrophages. *Biomaterials*, 35(3), 1074-1088. doi: DOI 10.1016/j.biomaterials.2013.10.041
- Mulvaney, P., Liz-Marzan, L. M., Giersig, M., & Ung, T. (2000). Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters. *Journal of Materials Chemistry*, 10(6), 1259-1270. doi: Doi 10.1039/B000136h
- Muro, S., Garnacho, C., Champion, J. A., Leferovich, J., Gajewski, C., Schuchman, E. H., . . . Muzykantov, V. R. (2008). Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers. *Molecular Therapy*, 16(8), 1450-1458. doi: Doi 10.1038/Mt.2008.127
- Murphy, M. P. (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1411(2-3), 401-414. doi: Doi 10.1016/S0005-2728(99)00029-8
- Muthusamy, B., Hanumanthu, G., Suresh, S., Rekha, B., Srinivas, D., Karthick, L., . . . Pandey, A. (2005). Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research. *Proteomics*, 5(13), 3531-3536. doi: DOI 10.1002/pmic.200401335
- Na, H. B., Song, I. C., & Hyeon, T. (2009). Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Advanced materials*, 21(21), 2133-2148. doi: DOI 10.1002/adma.200802366
- Nacey, J. N., Horsfall, D. J., Delahunt, B., & Marshall, V. R. (1986). The assessment of urinary catheter toxicity using cell cultures: validation by comparison with an animal model. *The Journal of urology*, 136(3), 706-709. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:3735560
- Nagami, K., Kawashima, Y., Kuno, H., Kemi, M., & Matsumoto, H. (2002). In vitro cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and

neutrophils. *J Toxicol Sci*, 27(3), 191-203. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12238143>

- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M., Ahmed, F. J., Maitra, A., Prashant, C., & Dinda, A. K. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International journal of nanomedicine*, 5 983-989. doi: 10.2147/IJN.S13244
- Natte, K., Friedrich, J. F., Wohlrab, S., Lutzki, J., von Klitzing, R., Osterle, W., & Orts-Gil, G. (2013). Impact of polymer shell on the formation and time evolution of nanoparticle-protein corona. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 104 213-220. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.019
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627. doi: 10.1126/science.1114397
- Nel, A. E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., . . . Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7), 543-557. doi: 10.1038/nmat2442
- Neuberger, T., Schopf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., & von Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 293(1), 483-496. doi: DOI 10.1016/j.jmmm.2005.01.064
- Nguyen, K. C., Seligy, V. L., & Tayabali, A. F. (2013). Cadmium telluride quantum dot nanoparticle cytotoxicity and effects on model immune responses to *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotoxicology*, 7(2), 202-211. doi: 10.3109/17435390.2011.648667
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 6(11), 1028-1042. doi: DOI 10.1038/sj.cdd.4400598
- Nirmal, M., & Brus, L. (1999). Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals. *Accounts of chemical research*, 32(5), 407-414. doi: Doi 10.1021/Ar9700320
- O. Hauger, Y. Delmas, C. Deminiere, P. Merville, C. Combe, & Grenier., N. (2004). *Late Sinerem-enhanced MR imaging of renal diseases: a pilot study*. Chicago.
- Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., . . . Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2 8. doi: 10.1186/1743-8977-2-8
- Ogawara, K., Furumoto, K., Nagayama, S., Minato, K., Higaki, K., Kai, T., & Kimura, T. (2004). Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 100(3), 451-455. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.07.028
- Oh, W. K., Kim, S., Choi, M., Kim, C., Jeong, Y. S., Cho, B. R., . . . Jang, J. (2010). Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Innate Immune Response of Silica - Titania Hollow

- Nanoparticles Based on Size and Surface Functionality. *ACS nano*, 4(9), 5301-5313. doi: Doi 10.1021/Nn100561e
- Oostingh, G. J., Casals, E., Italiani, P., Colognato, R., Stritzinger, R., Ponti, J., . . . Boraschi, D. (2011). Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Particle and Fibre Toxicology*, 8. doi: Artn 8
- Doi 10.1186/1743-8977-8-8
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., . . . Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Small*, 5(18), 2067-2076. doi: DOI 10.1002/smll.200900466
- Pareek, N., Gillgren, T., & Jonsson, L. J. (2013). Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. *Bioresource technology*, 148 70-77. doi: 10.1016/j.biortech.2013.08.121
- Park, M. V. D. Z., Annema, W., Salvati, A., Lesniak, A., Elsaesser, A., Barnes, C., . . . de Jong, W. H. (2009). In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(1), 108-116. doi: DOI 10.1016/j.taap.2009.07.019
- Patel, H. M. (1992). Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 9(1), 39-90. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1544174>
- Patel, H. M., & Moghimi, S. M. (1998). Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system - The concept of tissue specificity. *Advanced drug delivery reviews*, 32(1-2), 45-60. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837635>
- Pelaz, B., Charron, G., Pfeiffer, C., Zhao, Y., de la Fuente, J. M., Liang, X. J., . . . Del Pino, P. (2013). Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. *Small*, 9(9-10), 1573-1584. doi: 10.1002/smll.201201229
- Peng, Q., Zhang, S., Yang, Q., Zhang, T., Wei, X. Q., Jiang, L., . . . Lin, Y. F. (2013). Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system. *Biomaterials*, 34(33), 8521-8530. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.102
- Peng, X. H., Qian, X., Mao, H., Wang, A. Y., Chen, Z. G., Nie, S., & Shin, D. M. (2008). Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *International journal of nanomedicine*, 3(3), 311-321. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990940>
- Perumal, O. P., Inapagolla, R., Kannan, S., & Kannan, R. M. (2008). The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials*, 29(24-25), 3469-3476. doi: DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.04.038
- Petushkov, A., Intra, J., Graham, J. B., Larsen, S. C., & Salem, A. K. (2009). Effect of crystal size and surface functionalization on the cytotoxicity of silicalite-1 nanoparticles. *Chemical research in toxicology*, 22(7), 1359-1368. doi: 10.1021/tx900153k
- Poulin, S., Franca, R., Moreau-Belanger, L., & Sacher, E. (2010). Confirmation of X-ray Photoelectron Spectroscopy Peak Attributions of Nanoparticulate Iron Oxides, Using

- Symmetric Peak Component Line Shapes. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(24), 10711-10718. doi: Doi 10.1021/Jp100964x
- Price, M. E., Cornelius, R. M., & Brash, J. L. (2001). Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma. *Biochimica et biophysica acta*, 1512(2), 191-205. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406096>
- Qian, W. J., Jacobs, J. M., Camp, D. G., 2nd, Monroe, M. E., Moore, R. J., Gritsenko, M. A., . . . Smith, R. D. (2005). Comparative proteome analyses of human plasma following in vivo lipopolysaccharide administration using multidimensional separations coupled with tandem mass spectrometry. *Proteomics*, 5(2), 572-584. doi: 10.1002/pmic.200400942
- Rabe, M., Verdes, D., & Seeger, S. (2011). Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in colloid and interface science*, 162(1-2), 87-106. doi: DOI 10.1016/j.cis.2010.12.007
- Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Yahia, L., & Mahmoudi, M. (2013). *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface* (vol. 15).
- Ratner, B. D. (1996). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego.
- Reddy, G. R., Bhojani, M. S., McConville, P., Moody, J., Moffat, B. A., Hall, D. E., . . . Ross, B. D. (2006). Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clinical Cancer Research*, 12(22), 6677-6686. doi: Doi 10.1158/1078-0432.Ccr-06-0946
- Reimer, P., & Balzer, T. (2003). Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *European Radiology*, 13(6), 1266-1276. doi: DOI 10.1007/s00330-002-1721-7
- Rezwan, K., Meier, L. P., Rezwan, M., Voros, J., Textor, M., & Gauckler, L. J. (2004). Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al₂O₃ particles: A new model based on zeta potential and UV-vis measurements. *Langmuir*, 20(23), 10055-10061. doi: Doi 10.1021/La048459k
- Rivet, C. J., Yuan, Y., Borca-Tasciuc, D. A., & Gilbert, R. J. (2012). Altering Iron Oxide Nanoparticle Surface Properties Induce Cortical Neuron Cytotoxicity. *Chemical research in toxicology*, 25(1), 153-161. doi: Doi 10.1021/Tx200369s
- Rocker, C., Potzl, M., Zhang, F., Parak, W. J., & Nienhaus, G. U. (2009). A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 4(9), 577-580. doi: Doi 10.1038/Nnano.2009.195
- Rosenholm, J. M., & Linden, M. (2008). Towards establishing structure-activity relationships for mesoporous silica in drug delivery applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 128(2), 157-164. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.02.013
- Ruan, J., Wang, K., Song, H., Xu, X., Ji, J., & Cui, D. (2011). Biocompatibility of hydrophilic silica-coated CdTe quantum dots and magnetic nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 6(1), 299. doi: 10.1186/1556-276X-6-299

- Safi, M., Sarrouj, H., Sandre, O., Mignet, N., & Berret, J. F. (2010). Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state. *Nanotechnology*, 21(14), 145103. doi: 10.1088/0957-4484/21/14/145103
- Sahoo, S. K., Parveen, S., & Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 3(1), 20-31. doi: DOI 10.1016/j.nano.2006.11.008
- Sakagami, M. (2006). In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 58(9-10), 1030-1060. doi: DOI 10.1016/j.addr.2006.07.012
- Saptarshi, S. R., Duschl, A., & Lopata, A. L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*, 11. doi: Artn 26
Doi 10.1186/1477-3155-11-26
- Savill, J. (1998). Apoptosis - Phagocytic docking without shocking. *Nature*, 392(6675), 442-443. doi: Doi 10.1038/33025
- Sayes, C. M., Reed, K. L., & Warheit, D. B. (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicological Sciences*, 97(1), 163-180. doi: DOI 10.1093/toxsci/kfm018
- Schaeublin, N. M., Braydich-Stolle, L. K., Schrand, A. M., Miller, J. M., Hutchison, J., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2011). Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale*, 3(2), 410-420. doi: Doi 10.1039/C0nr00478b
- Schoepf, U., Marecos, E. M., Melder, R. J., Jain, R. K., & Weissleder, R. (1998). Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. *BioTechniques*, 24(4), 642-646, 648-651. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564539>
- Schulze, C., Kroll, A., Lehr, C. M., Schafer, U. F., Becker, K., Schneckeburger, J., . . . Wohlleben, W. (2008). Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2(2), 51-U17. doi: Doi 10.1080/17435390802018378
- Schutt, W., Gruttner, C., Hafeli, U., Zborowski, M., Teller, J., Putzar, H., & Schumichen, C. (1997). Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy - Possibilities and limitations: A mini-review. *Hybridoma*, 16(1), 109-117. doi: DOI 10.1089/hyb.1997.16.109
- Scott, C. F. (1991). Mechanism of the participation of the contact system in the Vroman effect. Review and summary. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2(3), 173-181. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1854683>
- Seabra, A. B., Pankotai, E., Feher, M., Somlai, A., Kiss, L., Biro, L., . . . Lacza, Z. (2007). S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *The British journal of dermatology*, 156(5), 814-818. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07718.x

- Seghaye, M. C., Duchateau, J., Bruniaux, J., Demontoux, S., Detruit, H., Bosson, C., . . . Planche, C. (1997). Endogenous nitric oxide production and atrial natriuretic peptide biological activity in infants undergoing cardiac operations. *Critical care medicine*, 25(6), 1063-1070. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9201062>
- Seib, F. P., Jones, G. T., Rnjak-Kovacina, J., Lin, Y. N., & Kaplan, D. L. (2013). pH-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials*, 2(12), 1606-1611. doi: DOI 10.1002/adhm.201300034
- Sela, M. N., Badihi, L., Rosen, G., Steinberg, D., & Kohavi, D. (2007). Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 18(5), 630-638. doi: DOI 10.1111/j.1600-0501.2007.01373.x
- Shi, H., Sui, Y., Wang, X., Luo, Y., & Ji, L. (2005). Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 140(1), 115-121. doi: 10.1016/j.cca.2005.01.009
- Shin, J. H., Metzger, S. K., & Schoenfisch, M. H. (2007). Synthesis of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 129(15), 4612-4619. doi: 10.1021/ja0674338
- Shinde Patil, V. R., Campbell, C. J., Yun, Y. H., Slack, S. M., & Goetz, D. J. (2001). Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophysical Journal*, 80(4), 1733-1743. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259287>
- Shubayev, V. I., Pisanic, T. R., & Jin, S. H. (2009). Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 467-477. doi: DOI 10.1016/j.addr.2009.03.007
- Silva, L. P., Lacava, Z. G. M., Buske, N., Morais, P. C., & Azevedo, R. B. (2004). Atomic force microscopy and transmission electron microscopy of biocompatible magnetic fluids: A comparative analysis. *Journal of Nanoparticle Research*, 6(2-3), 209-213. doi: Doi 10.1023/B:Nano.0000034597.83456.6e
- SIMON-DECKERS, A. (2008). *EFFETS BIOLOGIQUES DE NANOPARTICULES MANUFACTUREES : INFLUENCE DE LEURS CARACTERISTIQUES*. (Agro Paris Tech, Paris).
- Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., & Carriere, M. (2008). In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*, 253(1-3), 137-146. doi: 10.1016/j.tox.2008.09.007
- Singh, M., Chakrapani, A., & O'Hagon, D. (2007). Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Review of Vaccines*, 6(5), 797-808. doi: Doi 10.1586/14760584.6.5.797
- Singh, N., Jenkins, G. J., Asadi, R., & Doak, S. H. (2010). Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano reviews*, 1. doi: 10.3402/nano.v1i0.5358
- Singh, S. K., Singh, M. K., Nayak, M. K., Kumari, S., Shrivastava, S., Gracio, J. J., & Dash, D. (2011). Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets. *ACS nano*, 5(6), 4987-4996. doi: 10.1021/nn201092p

- Skepo, M. (2008). Model simulations of the adsorption of statherin to solid surfaces: Effects of surface charge and hydrophobicity. *Journal of Chemical Physics*, 129(18). doi: Artn 185101
Doi 10.1063/1.3002317
- Soenen, S. J., Himmelreich, U., Nuytten, N., & De Cuyper, M. (2011). Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*, 32(1), 195-205. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.075
- Soenen, S. J. H., Nuytten, N., De Meyer, S. F., De Smedt, S. C., & De Cuyper, M. (2010). High Intracellular Iron Oxide Nanoparticle Concentrations Affect Cellular Cytoskeleton and Focal Adhesion Kinase-Mediated Signaling. *Small*, 6(7), 832-842. doi: DOI 10.1002/smll.200902084
- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W., & Tang, L. P. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, 7. doi: Artn 22
Doi 10.1186/1743-8977-7-22
- Solina, A., Papp, D., Ginsberg, S., Krause, T., Grubb, W., Scholz, P., . . . Cody, R. (2000). A comparison of inhaled nitric oxide and milrinone for the treatment of pulmonary hypertension in adult cardiac surgery patients. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 14(1), 12-17. doi: Doi 10.1016/S1053-0770(00)90048-X
- Sonvico, F., Mornet, S., Vasseur, S., Dubernet, C., Jaillard, D., Degrouard, J., . . . Couvreur, P. (2005). Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjugate chemistry*, 16(5), 1181-1188. doi: 10.1021/bc050050z
- Sounderya, N., & Zhang, Y. (2008). *Brevet Singapore n°*: F. o. E. Division of Bioengineering, National University of Singapore.
- Sousa, S. R., Manuela Bras, M., Moradas-Ferreira, P., & Barbosa, M. A. (2007). Dynamics of fibronectin adsorption on TiO₂ surfaces. *Langmuir*, 23(13), 7046-7054. doi: Doi 10.1021/La062956e
- Stanicki, D., Boutry, S., Laurent, S., Wacheul, L., Nicolas, E., Crombez, D., . . . Muller, R. N. (2014). Carboxy-silane coated iron oxide nanoparticles: a convenient platform for cellular and small animal imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(4), 387-397. doi: Doi 10.1039/C3tb21480j
- Stark, W. J. (2011). Nanoparticles in biological systems. *Angewandte Chemie*, 50(6), 1242-1258. doi: 10.1002/anie.200906684
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., & Witztum, J. L. (1989). Beyond Cholesterol - Modifications of Low-Density Lipoprotein That Increase Its Atherogenicity. *New England Journal of Medicine*, 320(14), 915-924. Tiré de <Go to ISI>://WOS:A1989T953400007

- Storm, B. L., Abbitt, P. L., Allen, D. A., & Ros, P. R. (1992). Splenosis - Superparamagnetic Iron-Oxide Enhanced Mr Imaging. *American Journal of Roentgenology*, 159(2), 333-335. Tiré de <Go to ISI>://A1992JE56700020
- Subbiahdoss, G., Sharifi, S., Grijpma, D. W., Laurent, S., van der Mei, H. C., Mahmoudi, M., & Busscher, H. J. (2012). Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci. *Acta biomaterialia*, 8(6), 2047-2055. doi: 10.1016/j.actbio.2012.03.002
- Suh, W. H., Suslick, K. S., Stucky, G. D., & Suh, Y. H. (2009). Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 87(3), 133-170. doi: DOI 10.1016/j.pneurobio.2008.09.009
- Talja, M., Andersson, L. C., Ruutu, M., & Alfthan, O. (1985). Toxicity testing of urinary catheters. *British journal of urology*, 57(5), 579-584. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:3904909
- Tallheden, T., Nannmark, U., Lorentzon, M., Rakotonirainy, O., Soussi, B., Waagstein, F., . . . Omerovic, E. (2006). In vivo MR imaging of magnetically labeled human embryonic stem cells. *Life Sciences*, 79(10), 999-1006. doi: DOI 10.1016/j.lfs.2006.05.021
- Thorek, D. L. J., & Tsourkas, A. (2008). Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*, 29(26), 3583-3590. doi: DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.05.015
- Torres, A. L., Santos, S. G., Oliveira, M. I., & Barbosa, M. A. (2013). Fibrinogen promotes resorption of chitosan by human osteoclasts. *Acta biomaterialia*, 9(5), 6553-6562. doi: 10.1016/j.actbio.2013.01.015
- Ullrich, V., & Kissner, R. (2006). Redox signaling: Bioinorganic chemistry at its best. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(12), 2079-2086. doi: DOI 10.1016/j.jinorgbio.2006.09.019
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L. O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S., & Schins, R. P. F. (2007). Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1(1), 52-71. doi: Doi 10.1080/00222930701314932
- Vallhov, H., Qin, J., Johansson, S. M., Ahlborg, N., Muhammed, M. A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2006). The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. *Nano Letters*, 6(8), 1682-1686. doi: Doi 10.1021/NI060860z
- Veisesh, O., Sun, C., Gunn, J., Kohler, N., Gabikian, P., Lee, D., . . . Zhang, M. Q. (2005). Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas. *Nano Letters*, 5(6), 1003-1008. doi: Doi 10.1021/NI0502569
- Verma, A., & Stellacci, F. (2010). Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small*, 6(1), 12-21. doi: DOI 10.1002/sml.200901158
- Vogler, E. A. (2012). Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*, 33(5), 1201-1237. doi: DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.10.059
- von zur Muhlen, C., von Elverfeldt, D., Bassler, N., Neudorfer, I., Steitz, B., Petri-Fink, A., . . . Peter, K. (2007). Superparamagnetic iron oxide binding and uptake as imaged by magnetic resonance is mediated by the integrin receptor Mac-1 (CD11b/CD18):

- Implications on imaging of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 193(1), 102-111. doi: DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.048
- Vroman, L., Adams, A. L., Fisher, G. C., & Munoz, P. C. (1980). Interaction of high molecular weight kininogen, Factor XII and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*, 55 156–159
- Walczyk, D., Bombelli, F. B., Monopoli, M. P., Lynch, I., & Dawson, K. A. (2010). What the cell "sees" in bionanoscience. *Journal of the American Chemical Society*, 132(16), 5761-5768. doi: 10.1021/ja910675v
- Walkey, C. D., & Chan, W. C. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society reviews*, 41(7), 2780-2799. doi: 10.1039/c1cs15233e
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free radical biology & medicine*, 27(5-6), 612-616. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490282>
- Wang, H., Li, Y., Zuo, Y., Li, J., Ma, S., & Cheng, L. (2007). Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 28(22), 3338-3348. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.014
- Wang, K. Y., Chuang, S. A., Lin, P. C., Huang, L. S., Chen, S. H., Ouarda, S., . . . Chen, Y. J. (2008). Multiplexed immunoassay: quantitation and profiling of serum biomarkers using magnetic nanoprobe and MALDI-TOF MS. *Analytical chemistry*, 80(16), 6159-6167. doi: 10.1021/ac800354u
- Weissleder, R., Cheng, H. C., Bogdanova, A., & Bogdanov, A., Jr. (1997). Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, 7(1), 258-263. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039625>
- Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E. A., & Basilion, J. P. (2000). In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nature Medicine*, 6(3), 351-355. doi: 10.1038/73219
- Witschger, O., & Fabries, J. F. (2005). *Particules ultra-fines et santé au travail. 1-caractéristiques et effets potentiels sur la santé.*
- Woo, K., Hong, J., Choi, S., Lee, H. W., Ahn, J. P., Kim, C. S., & Lee, S. W. (2004). Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 16(14), 2814-2818. doi: Doi 10.1021/Cm049552x
- Worle-Knirsch, J. M., Pulskamp, K., & Krug, H. F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters*, 6(6), 1261-1268. doi: Doi 10.1021/Nl060177c
- Wottrich, R., Diabate, S., & Krug, H. F. (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *International journal of hygiene and environmental health*, 207(4), 353-361. doi: 10.1078/1438-4639-00300
- Wyllie, A. H. (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol*, 153(4), 313-316. doi: 10.1002/path.1711530404

- Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., . . . Nel, A. E. (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters*, 6(8), 1794-1807. doi: Doi 10.1021/NI061025k
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2008). Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS nano*, 2(1), 85-96. doi: 10.1021/nn700256c
- Xia, X. R., Monteiro-Riviere, N. A., Mathur, S., Song, X. F., Xiao, L. S., Oldenberg, S. J., . . . Riviere, J. E. (2011). Mapping the Surface Adsorption Forces of Nanomaterials in Biological Systems. *ACS nano*, 5(11), 9074-9081. doi: Doi 10.1021/Nn203303c
- Xia, X. R., Monteiro-Riviere, N. A., & Riviere, J. E. (2010). An index for characterization of nanomaterials in biological systems. *Nature nanotechnology*, 5(9), 671-675. doi: Doi 10.1038/Nnano.2010.164
- Xu, H. H., Smith, D. T., & Simon, C. G. (2004). Strong and bioactive composites containing nano-silica-fused whiskers for bone repair. *Biomaterials*, 25(19), 4615-4626. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.12.058
- Xu, M., Li, J., Iwai, H., Mei, Q., Fujita, D., Su, H., . . . Hanagata, N. (2012). Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interactions. *Scientific reports*, 2 406. doi: 10.1038/srep00406
- Yancy, A. D., Olzinski, A. R., Hu, T. C. C., Lenhard, S. C., Aravindhan, K., Gruver, S. M., . . . Jucker, B. M. (2005). Differential uptake of ferumoxtran-10 and ferumoxytol, ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agents in rabbit: Critical determinants of atherosclerotic plaque labeling. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 21(4), 432-442. doi: Doi 10.1002/Jmri.20283
- Yang, H., Zhuang, Y., Sun, Y., Dai, A., Shi, X., Wu, D., . . . Yang, S. (2011). Targeted dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging of tumors using multifunctional gadolinium-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32(20), 4584-4593. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.018
- Yang, L. (2014). Endotoxin contamination: An interference for nanosafety studies. *NanoToes*.
- Yang, W., Peters, J. I., & Williams, R. O., 3rd. (2008). Inhaled nanoparticles--a current review. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), 239-247. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.02.011
- Yin, H., Too, H. P., & Chow, G. M. (2005). The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. *Biomaterials*, 26(29), 5818-5826. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:15949547
- Yong, G. (2005). *Biofunctionalization of Nanomaterials* Weinheim.
- Zabow, G., Dodd, S., Moreland, J., & Koretsky, A. (2008). Micro-engineered local field control for high-sensitivity multispectral MRI. *Nature*, 453(7198), 1058-1063. doi: 10.1038/nature07048
- Zhang, C. F., Jugold, M., Woenne, E. C., Lammers, T., Morgenstern, B., Mueller, M. M., . . . Kiessling, F. (2007). Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated

- ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer research*, 67(4), 1555-1562. doi: Doi 10.1158/0008-5475.Can-06-1668
- Zhang, W. X. (2003). Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *Journal of Nanoparticle Research*, 5(3-4), 323-332. doi: Doi 10.1023/A:1025520116015
- Zhang, X. F., Clime, L., Roberge, H., Normandin, F., Yahia, L., Sacher, E., & Veres, T. (2011). pH-Triggered Doxorubicin Delivery Based on Hollow Nanoporous Silica Nanoparticles with Free-Standing Superparamagnetic Fe₃O₄ Cores. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(5), 1436-1443. doi: Doi 10.1021/Jp1075498
- Zhang, X. F., Mansouri, S., Mbeh, D. A., Yahia, L., Sacher, E., & Veres, T. (2012a). Nitric oxide delivery by core/shell superparamagnetic nanoparticle vehicles with enhanced biocompatibility. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 28(35), 12879-12885. doi: 10.1021/la302357h
- Zhang, X. F., Mansouri, S., Mbeh, D. A., Yahia, L., Sacher, E., & Veres, T. (2012b). Nitric Oxide Delivery by Core/Shell Superparamagnetic Nanoparticle Vehicles with Enhanced Biocompatibility. *Langmuir*, 28(35), 12879-12885. doi: Doi 10.1021/La302357h
- Zhang, Y., Kohler, N., & Zhang, M. (2002). Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, 23(7), 1553-1561. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11922461>
- Zhang, Y., Sun, C., Kohler, N., & Zhang, M. (2004). Self-assembled coatings on individual monodisperse magnetite nanoparticles for efficient intracellular uptake. *Biomedical microdevices*, 6(1), 33-40. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15307442>
- Zhao, D. L., Zeng, X. W., Xia, Q. S., & Tang, J. T. (2009). Preparation and coercivity and saturation magnetization dependence of inductive heating property of Fe₃O₄ nanoparticles in an alternating current magnetic field for localized hyperthermia. *Journal of Alloys and Compounds*, 469(1-2), 215-218. doi: DOI 10.1016/j.jallcom.2008.01.083
- Zhao, M., Beauregard, D. A., Loizou, L., Davletov, B., & Brindle, K. M. (2001). Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. *Nature Medicine*, 7(11), 1241-1244. doi: Doi 10.1038/Nm1101-1241
- Zhou, Z., Annich, G. M., Wu, Y., & Meyerhoff, M. E. (2006). Water-soluble poly(ethylenimine)-based nitric oxide donors: preparation, characterization, and potential application in hemodialysis. *Biomacromolecules*, 7(9), 2565-2574. Tiré de <Go to ISI>://MEDLINE:16961319
- Zhu, A., Yuan, L., Jin, W., Dai, S., Wang, Q., Xue, Z., & Qin, A. (2009). Polysaccharide surface modified Fe₃O₄ nanoparticles for camptothecin loading and release. *Acta biomaterialia*, 5(5), 1489-1498. doi: 10.1016/j.actbio.2008.10.022

ANNEXES

ANNEXE A : Composition des milieux de culture et Composition du sérum bovin fœtal

Composition des milieux de culture

Component	F-12K [1x] g/L	DMEM/F12 [1x] g/L	DMEM g/L
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl ₂)	0.0333	0.1167	0.2000
Cupric Sulfate • 5H ₂ O (CuSO ₄ •5H ₂ O)	0.0000025	0.0000013	0
Ferrous Sulfate • 7H ₂ O (FeSO ₄ •7H ₂ O)	0.000834	0.000417	0
Magnesium Chloride (MgCl ₂)	0.0576	0.0286	0
Potassium Chloride (KCl)	0.224	0.3118	0.400
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	1.176	1.2	1.5000
Sodium Chloride (NaCl)	7.599	6.995	6.400
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous) (Na ₂ HPO ₄)	0.14204	0.071	0
Zinc Sulfate • 7H ₂ O (ZnSO ₄ •7H ₂ O)	0.000863	0.000430	0
Ferric nitrate (Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O) (Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O)	0	0.00005	0.00010
Magnesium sulfate (MgSO ₄)		0.0488	0.0977
Sodium phosphate, mono. (NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O)	0	0.0625	0.125
Amino Acids			
L-Alanine	0.009	0.00445	0
L-Arginine • HCl	0.211	0.1475	0.08
L-Asparagine • H ₂ O	0.01501	0.0075	0
L-Aspartic Acid	0.0133	0.00665	0
L-Cysteine • HCl • H ₂ O	0.035	0.01756	0.06260
L-Glutamic Acid	0.0147	0.00735	0
L-Glutamine	0	0	0.05847
Glycine	0.00751	0.01875	0.030
L-Histidine • 3HCl • H ₂ O	0.02096	0.03148	0.042
L-Isoleucine	0.00394	0.05447	0.105
L-Leucine	0.0131	0.059	0.105
L-Lysine • HCl	0.0365	0.09125	0.146
L-Methionine	0.00448	0.01724	0.030
L-Phenylalanine	0.00496	0.03548	0.066
L-Proline	0.0345	0.01725	0
L-Serine	0.0105	0.02625	0.042
L-Threonine	0.0119	0.05345	0.095
L-Tryptophan	0.00204	0.00902	0.016
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.00778	0.03870	0.10379
L-Valine	0.0117	0.05285	0.094
L-Cystine	0	0.024	0
Vitamins			
D-Biotin	0.0000073	0	0

Choline Chloride	0.01396	0.00898	0.00400
Folic Acid	0.00132	0.00265	0.00400
<i>myo</i> -Inositol	0.018	0	0.007
Niacinamide	0.000037	0.00202	0.00400
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00048	0	0.00400
Pyridoxine • HCl	0.000062	0.00200	0.000400
Riboflavin	0.000038	0.0000219	0.00040
Thiamine • HCl	0.00034	0.00217	0.00400
Vitamin B ₁₂	0.00136	0.00068	0
Biotin	0	0.0000035	0
i-Inositol		0.0126	0

Other

D-Glucose	1.802	3.151	4.500
Hypoxanthine	0.00408	0.00205	0
Linoleic Acid	0.000084	0.000042	0
Phenol Red • Na	0.0013	0.0081	0.0015
Putrescine • HCl	0.000161	0.000081	0
Pyruvic Acid • Na	0.11	0	0
Thioctic Acid	0.00021	0	0
Thymidine	0.00073	0	0
Sodium Pyruvate		0.055	0.11

Composition du sérum bovin fœtal

Component	Average	Range
Endotoxins (ng/ml)	0.35	0.01 - 10.0
Glucose (mg/ml)	1.25	0.85 - 1.81
Protein (mg/ml)	38	32 - 70
Albumin (mg/ml)	23	20 - 36
Hemoglobine (µg/ml)	113	24 - 181
Bilirubin, total (µg/ml)	4	3 - 11
Bilirubin, direct (µg/ml)	2	0 - 5
Urea (µg/ml)	160	140 - 200
Urate (µg/ml)	29	13 - 41
Creatinin (µg/ml)	31	16 - 43
Insulin (µU/ml)	10	6 - 14
Cortisol (ng/ml)	0.5	0.1 - 23
Growth hormone (ng/ml)	39.0	18.7 - 51.6
Parathormone, PTH (ng/ml)	1.72	0.085 - 6.18
Triiodothyronine, T3 (ng/ml)	1.2	0.56 - 2.23
Thyroxine, T4 (ng/ml)	0.12	0.08 - 0.16
Thyroid-stimulating hormone, TSH (ng/ml)	1.22	0.2 - 4.5
Follicle-stimulating hormone, FSH (pg/ml)	95	20 - 338
Testosterone (pg/ml)	400	210 - 990
Progesterone, P4 (pg/ml)	80	3 - 360
Prolactin = Luteotropic hormone, LTH (pg/ml)	176	20 - 500
Luteinizing hormone, LH ?? (pg/ml)	8	1,2 - 18
Prostaglandin E (ng/ml)	5.9	0.5 - 30.5
Prostaglandin F (ng/ml)	12.3	3.8 - 42.0
Vitamine A (ng/ml)	90	10 - 350
Vitamine E (ng/ml)	1.1	1 - 4.2
Cholesterol (µg/ml)	310	120 - 630
Lactate-dehydrogenase, LDH (mU/ml)	864	260 - 1,215
Alkaline Phosphatase (mU/ml)	255	110 - 352
Aspartate-Aminotransferase, ASAT (mU/ml)	130	20 - 200

Sodium, Na ⁺ (µeq/ml)	137	125 - 143
Potassium, K ⁺ (µeq/ml)	11.2	10.0 - 14.0
Calcium, Ca ²⁺ (µeq/ml)	6.75	6.30 - 7.15
Chloride, Cl ⁻ (µeq/ml)	103	98 - 108
Phosphate, P _i (µg/ml)	98	43 - 114
Selen (µg/ml)	0.026	0.014 - 0.038
pH	7.40	7.20 - 7.60

from Lindl, T. (2002): "Zell- und Gewebekultur". 5th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Annexe B : Preuve de concept

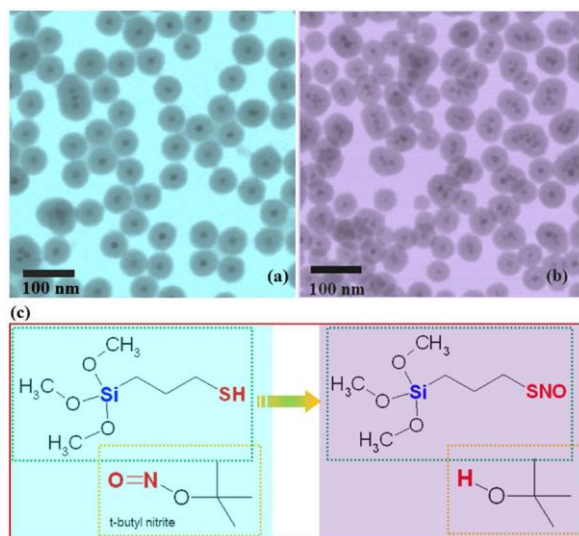
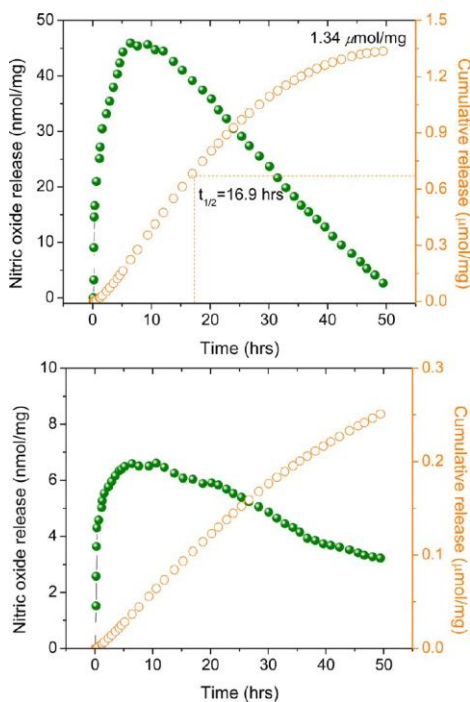
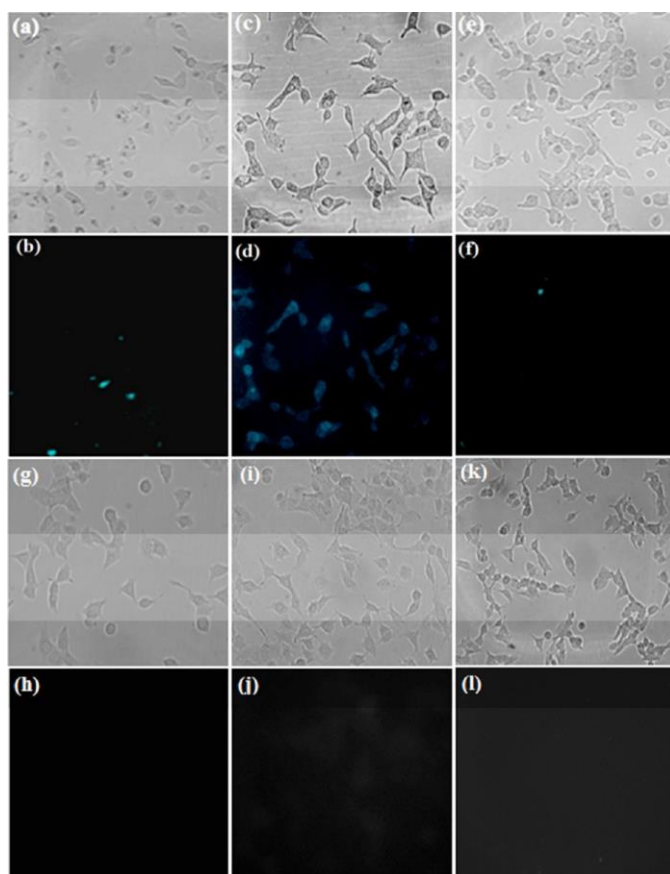


Image TEM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{silice}(\text{SH})$ et de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{silice}(-\text{SNO})$ (a, b). Schéma de l'oxyde nitrique greffé montrant le protocole de transformer des groupes fonctionnels SH au groupement $-\text{SNO}$ (c). (Zhang, X. F. et al., 2012b).



L'évaluation quantitative de la libération de NO des NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{silice}(-\text{SNO})$ dans la solution tampon PBS à 37 °C (en haut) et à 20 °C (en bas) (Zhang, X. F. et al., 2012b).



Images de la microscopie par fluorescence de la détection du NO de 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{silice}$ (-SNO) dans les cellules A549 avec des temps différents d'incubation de 3h (a, b), 24h (c, d) et 48 h (e, f). Des images de la détection du NO des cellules sans nanoparticules après une incubation de 3h (g, h), 24 h (i, j), et 48 h (k, l) (Zhang, X. F. et al., 2012b).